



TITLE:

ヒトインターフェロン- γ の遺伝子
工学的生産法および遺伝子発現機
構の研究(Dissertation_全文)

AUTHOR(S):

福永, 理己郎

CITATION:

福永, 理己郎. ヒトインターフェロン- γ の遺伝子工学的生産法および遺
伝子発現機構の研究. 京都大学, 1987, 理学博士

ISSUE DATE:

1987-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k3676>

RIGHT:



学位申請論文

福永理己郎

学 位 審 査 報 告

京大附図

氏 名	福 永 理 己 郎
学 位 の 種 類	理 学 博 士
学 位 記 番 号	理 博 第 号
学 位 授 与 の 日 付	昭 和 年 月 日
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 則 第 5 条 第 1 項 該 当
研 究 科 ・ 専 攻	理 学 研 究 科 化 学 専 攻
(学 位 論 文 題 目) ヒトインターフェロナー γ の遺伝子工学的生産法および遺伝子 発現機構の研究	
論 文 調 査 委 員	主 査 川 出 由 己 加 治 有 恒 波多野 博 行

(論文内容の要旨)

インターフェロナー (IFN- γ) は、マイトゲン刺激を受けたTリンパ球によって生産・分泌される糖タンパク質であり、ウイルス感染によって誘発されるIFNとは異なる構造を有している。IFN- γ の生理作用を明らかにするためには、その遺伝子構造の解析や高度精製標品を用いた研究が不可欠である。また、IFN- γ 遺伝子はTリンパ球で特異的に発現するが、この組織特異性を支配するメカニズムに関する知見は乏しい。本論文は、ヒトIFN- γ を遺伝子工学的に生産する方法、ならびに、IFN- γ 遺伝子の組織特異的発現の制御について述べたものである。

糖鎖を有する天然型ヒトIFN- γ を遺伝子工学的に生産する目的で、まず、ヒトIFN- γ cDNAがクローン化された。得られたcDNAの塩基配列から、IFN- γ の前駆体および成熟タンパク質のアミノ酸配列は、それぞれ166個、143個のアミノ酸残基から成ると推定された。クローン化したヒトIFN- γ cDNAをSV40初期プロモーターの下流に接続した雑種遺伝子を構築してウシパピローマウイルス (BPV) ベクターと接続した。このDNAをマウス培養細胞に導入して得られたトランスホーム細胞は、ヒトIFN- γ を構成的に生産し、培養上清中のIFN力価は $3 \sim 4 \times 10^5$ 国際単位/ ml に達した。これは従来行なわれていた天然IFN- γ 生産量の10～100倍であった。導入した組み換え体は細胞あたり30～50コピーの染色体外環状DNAとして存在しており、gene dosage effect およびSV40プロモーターの強い転写活性によって高い発現量が得られたものと考えられる。さらに、この組み換えIFN- γ を簡便な操作で均一に精製し、その分子量、アミノ末端アミノ酸配列、(Con A-Sepharose への吸着性などを検討した。その結果、マウス細胞で生産したヒトIFN- γ は、糖鎖を有する天然のヒトIFN- γ と同じ性状を示すことが明らかとなった。

つぎに、IFN- γ 遺伝子の組織特異的発現の制御にDNAメチル化機構が関与している可能性を検討するために、種々のIFN- γ 産生細胞と非産

生細胞についてIFN- γ 遺伝子領域のCCGG配列におけるDNAメチル化パターンを解析した。CCGG配列のメチル化の程度は、認識塩基配列のシトシン残基がメチル化していない場合にのみ切断できる制限酵素Hpa II (CmCGG感受性)とメチル化に関わりなく切断できる制限酵素Msp I (CmCGG非感受性)を用いたSouthernハイブリダイゼーションによって解析した。正常リンパ球や子宮組織のDNAについて調べた結果、IFN- γ 遺伝子近傍のCCGG配列は、リンパ球の非T細胞画分や子宮組織では高度にメチル化されているのに対し、IFN- γ 産生細胞を含むT細胞画分の一部の細胞では低メチル化状態にあることが示された。また、IFN- γ 産生能の異なる種々のTリンパ系株化培養細胞では、IFN- γ 遺伝子近傍のDNAメチル化の程度とその発現量に逆相関性が観察され、IFN- γ 遺伝子発現にDNAメチル化状態が必要であることが示された。しかし、IFN- γ を全く生産しない上皮系株化培養細胞でもIFN- γ 遺伝子が低メチル化状態にある例が見出されることから、低メチル化状態はIFN- γ 遺伝子発現の十分条件ではないことが示された。

(論文審査の結果の要旨)

インターフェロン- γ (IFN- γ) は、感作抗原やマイトゲンの刺激によってTリンパ球の生産するホルモン様の糖タンパク質であり、抗ウイルス作用、細胞増殖抑制作用、免疫機構調節作用など多面的な生理活性を有している。IFN- γ の生理作用や物質的性状を解明するためには、高度に精製された大量の標品が用意される必要がある。また、IFN- γ 遺伝子の組織特異的発現も興味ある課題である。申請者は、ほぼ天然のものに近いIFN- γ を遺伝子工学的に大量生産する新しい方法を開発し、同時に、IFN- γ 遺伝子のDNAメチル化による組織特異的発現の制御について新しい知見を得た。

動物細胞が微量にしか生産しないタンパク質の大量生産の目的で、近年、大腸菌を用いて遺伝子工学的に生産する方法が開発されている。しかしながら、大腸菌の生産するタンパク質はそのアミノ末端がメチオニンであり、糖鎖も付加されないことから、動物細胞の生産する天然のタンパク質の構造とかならずしも同一ではない。糖鎖をもつ天然型IFN- γ を遺伝子工学的に大量生産するために、申請者は、まずヒトIFN- γ cDNAをクローン化した。得られたcDNAをSV40初期プロモーターの下流に接続した雑種遺伝子を構築し、これをウシパピローマウイルス(BPV)ベクターに接続した。このDNAをマウス細胞に導入して得られたトランスフォーム細胞は、ヒトIFN- γ を構成的かつ大量に生産した。マウス細胞の生産したヒトIFN- γ は、分子量、アミノ末端アミノ酸配列、糖鎖の存在などの点でヒトTリンパ球の生産するIFN- γ とほぼ等しい性状を示した。

IFN- γ 遺伝子はTリンパ球で発現されるが、この組織特異性を支配するメカニズムに関する分子生物学研究はほとんどなされていない。申請者は、IFN- γ 遺伝子の発現制御にDNAメチル化が関与している可能性を考え、検討した。その結果、末梢血リンパ球の一部でIFN- γ 遺伝子近傍のCCGG配列が低メチル化状態にあることが見出された。IFN- γ 生

産能をもたないリンパ球の非T細胞画分や子宮組織では高度にメチル化されていた。また、IFN- γ 生産能の異なる種々のTリンパ芽球で、IFN- γ 遺伝子のメチル化の程度と発現量が逆相関していた。しかし、IFN- γ を全く生産しない株化細胞のIFN- γ 遺伝子が低メチル化状態になっている場合も見出され、この遺伝子の組織特異的発現には脱メチル化の他に別の機構も関与することが示唆された。

申請者の開発した動物細胞による糖タンパク質の遺伝子工学的生産方法は、実際のヒトIFN- γ の製造にも応用されるものとして高く評価される。また、DNAメチル化によるIFN- γ 遺伝子の発現制御に関する申請者の研究結果は、動物遺伝子発現調節機構について新しい知見を付け加えるものとして評価できる。

よって本論文は、理学博士の学位論文として価値あるものと認める。

なお、主論文および参考論文に報告されている研究業績を中心とし、これに関連した研究分野について試問した結果、合格と認めた。

学位申請論文

ヒトインターフェロン- γ の遺伝子工学的生産法および遺伝子発現機構の研究

京都大学大学院理学研究科

化学専攻博士後期課程

福永理己郎

(昭和61年3月24日研究指導認定)

目次

要 旨	1 ~ 2 項
-----	---------

略 号 表	3 項
-------	-----

序 論	4 ~ 1 2 項
-----	-----------

1. インターフェロン	4
2. ヒトインターフェロンの性状と遺伝子構造	4
3. 組み換えDNA 技術によるインターフェロンの生産	8
4. DNA メチル化機構と遺伝子発現	10

材料と方法	1 3 ~ 2 8 項
-------	-------------

1. 試薬類	1 3
2. プラスミドDNA	1 4
3. ヒトリンパ球および子宮組織	1 4
4. 株化培養細胞	1 5
5. ウイルス	1 6
6. インターフェロンの力価測定	1 6
7. RNA の抽出	1 7
8. ポリ (A) ⁺ RNA の精製と分画	1 7
9. アフリカツメガエル卵母細胞による IFN- γ mRNA の活性測定	1 8
10. 二重鎖 cDNA の合成と cDNA ライブラリーの作製	1 8
11. 合成オリゴヌクレオチドおよび二重鎖 DNA の ³² P 標識	1 9
12. コロニーハイブリダイゼーション	20
13. DNA の調製と制限酵素反応	21
14. DNA のアガロースゲル電気泳動とこれによる DNA 断片の精製	21
15. DNA 塩基配列の決定	22
16. 組み換えプラスミドの構築	22
17. 組み換え遺伝子の培養鎖への導入 (トランスフェクション)	24
18. マウス細胞由来ヒト IFN- γ の精製	25
19. NH ₂ -末端アミノ酸配列の決定	26
20. 組み換え IFN- α 5 の ³⁵ S 標識と免疫沈降	27
21. Northern および Southern トランスファー	27
22. Southern および Northern ハイブリダイゼーション	28

結 果

29～65項

第一部、ヒト IFN- γ の cDNA および染色体遺伝子の単離と構造解析 29～39項

- | | |
|---------------------------------|----|
| 1. ヒト脾リンパ球による IFN- γ の産生 | 29 |
| 2. IFN- γ mRNA の抽出と部分精製 | 31 |
| 3. IFN- γ cDNA の単離と構造解析 | 33 |
| 4. IFN- γ 染色体 DNA の単離 | 37 |

第二部、マウス培養細胞によるヒト IFN- γ および IFN- α 5 の生産 40～56項

- | | |
|---|----|
| 5. ヒト IFN- γ cDNA のサル COS-7 細胞における発現 | 40 |
| 6. BPV-IFN 組み換え体の構築 | 41 |
| 7. マウス C127 細胞のトランスホメーションと
IFN 産生細胞の単離 | 42 |
| 8. 組み換え DNA の存在状態 | 44 |
| 9. トランスホーム細胞による組み換え IFN の生産とその生理活性 | 46 |
| 10. 組み換え IFN- γ の精製とその分子的性状 | 50 |
| 11. 組み換えヒト IFN- γ の NH ₂ -末端アミノ酸の同定 | 53 |
| 12. 組み換えヒト IFN- α 5 の分子量 | 56 |

第三部、ヒト IFN- γ 遺伝子近傍のメチル化レベルの解析

57～65項

- | | |
|--|----|
| 13. 末梢血 T リンパ球に特異的に見出される IFN- γ 遺伝子の
低メチル化 | 57 |
| 14. T リンパ系株化培養細胞における IFN- γ 遺伝子の低メチ
ル化状態 | 60 |
| 15. 上皮系株化培養細胞における IFN- γ , γ -グロビン両遺伝子の低メ
チル化 | 65 |

考 察

66～74項

- | | |
|--|----|
| 1. ヒトインターフェロン- γ の構造 | 66 |
| 2. マウス細胞によるヒトインターフェロンの生産 | 66 |
| 3. IFN- γ 遺伝子発現における DNA メチル化機構の意義 | 70 |

謝 辞

75項

引 用 文 献

76～86項

要 旨

インターフェロン- γ (IFN- γ) は、感作抗原やT細胞マイトゲンの刺激を受けたTリンパ球によって生産・分泌されるホルモン様タンパク質であり、他の細胞に抗ウイルス性(ウイルスに対する抵抗性)を賦与する作用や免疫担当細胞の活性化をはじめ、多面的な生理活性を有している。IFN- γ の生理作用を明らかにするためには、その遺伝子構造の解析や高度精製標品を用いた研究が不可欠である。また、IFN- γ 遺伝子はTリンパ球で特異的に発現する遺伝子であるが、この組織特異性を支配するメカニズムに関する分子生物学的な知見は乏しい。本研究では、まずヒトIFN- γ のcDNA を単離した後、これを用いてヒトIFN- γ の遺伝子工学的生産法ならびに遺伝子発現機構に関する研究を行い、以下の知見を得た。

(1) . ヒト脾細胞からIFN- γ mRNA を抽出し、そのcDNA をクローン化した。得られたcDNA の塩基配列は、既に報告されているIFN- γ cDNA の配列と完全に同一であった。IFN- γ の前駆体および成熟タンパク質のアミノ酸配列は、それぞれ166 個、143 個のアミノ酸残基から成ると推定された。

(2) . クローン化したヒトIFN- γ cDNA あるいはIFN- α 5 遺伝子をSV40 初期プロモーターの下流に接続した雑種遺伝子を構築し、これらをウシパピローマウイルス(BPV) ベクターと接続した。このDNA をマウス培養細胞であるC127 細胞に導入して得られたトランスホーム細胞は、ヒトIFN- γ やIFN- α 5 を構成的に産生し、培養上清中のIFN 力価は $3 \sim 4 \times 10^5$ 国際単位/ml に達した。これは、従来行われていた天然IFN 生産量の10~100 倍の力価であった。導入した組み換え体は細胞あたり30~50 コピーの染色体外環状DNA として存在しており、gene dosage effect およびSV40 プロモーターの強い転写活性によって高い発現量が得られたものと考えられる。さらに、この組み換えIFN- γ を簡便な操作で均一に精製し、その性状を天然ヒトIFN- γ と比較した。マウス細胞で生産したヒトIFN- γ は、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動における分子量(24~26 K), ゲル濾過クロマトグラフィーにおけるネイティブな分子量(約58 K), 比活性($7 \sim 8 \times 10^7$ 国際単位/mg タンパク質), NH₂-末端アミノ酸配列などの点に関して、天然のヒトIFN- γ と同等の数値, 性状を示した。さらに、Con A-Sepharose に特異的に吸着することと分

子量の値から、糖鎖構造を有していることも示された。また、マウス細胞で生産したヒト IFN- α 5 の分子量は、推定アミノ酸配列から計算される分子量（19,500）とよい一致を示したが、マウス細胞由来の組み換えヒト IFN- α 5 と大腸菌由来のヒト IFN- α 5 ではマウス細胞に対する交叉活性に差異が認められた。以上の結果は、筆者の試みたマウス細胞での発現系が天然の IFN と同様の構造・性状を有する IFN を大量生産する系として優れたものであることを示している。

（３）．IFN- γ 遺伝子の組織特異的発現の制御に DNA メチル化機構が関与している可能性を検討するために、種々の IFN- γ 産生細胞と非産生細胞について IFN- γ 遺伝子領域の CCGG 配列における DNA メチル化パターンを解析した。CCGG 配列のメチル化の程度は、認識塩基配列のシトシン残基がメチル化していない場合にのみ切断できる制限酵素 *Hpa*II（CmCGG 感受性）とメチル化に関わりなく切断できる制限酵素 *Msp*I（CmCGG 非感受性）を用いた Southern ハイブリダイゼーションによって解析した。正常リンパ球や子宮組織の DNA について調べた結果、IFN- γ 遺伝子近傍の CCGG 配列は、リンパ球の非 T 細胞画分や子宮組織では高度にメチル化されているのに対し、IFN- γ 産生細胞を含む T 細胞画分の一部の細胞では低メチル化状態にあることが示された。また、IFN- γ 産生能の異なる種々の T リンパ系株化培養細胞では、IFN- γ 遺伝子近傍の DNA メチル化の程度とその発現量に逆相関性が観察され、IFN- γ 遺伝子発現に DNA メチル化状態が必要であることが示唆された。しかし、IFN- γ を全く産生しない上皮系株化培養細胞でも IFN- γ 遺伝子が低メチル化状態にある例が見出されることから、低メチル化状態は IFN- γ 遺伝子発現の十分条件ではないことが示された。

略 号 表

BPV	bovine papilloma virus:	ウシパピローマウイルス
BSA	bovine serum albumin:	ウシ血清アルブミン
cDNA	complementary DNA:	相補的DNA
CHO 細胞	chinese hanster ovary cell	
Con A	concanavalin A:	コンカナバリン A
CPE	cytopathic effect:	細胞変性効果
CPG	controlled-pore glass	
CS	calf serum:	仔ウシ血清
DEAE	diethylaminoethyl	
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium:	Dulbecco 変法 Eagle 培地
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid:	エチレンジアミン四酢酸
EMCV	encephalomyocarditis virus	
FCS	fetal calf serum:	ウシ胎児血清
GTC	guanidinium thiocyanate:	チオシアン酸グアニジン
HBS	Hepes-buffered saline	
Hepes	N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid	
HPLC	high performance liquid chromatography:	高速液体クロマト グラフィー
HTLV-I	human T-lymphotropic virus type I	
IFN	interferon:	インターフェロン
IU	international unit(s):	国際単位
kb	kilobase pair(s)	キロ塩基対
MEM	Eagle's minimal essential medium:	Eagle の最小必須培地
Mops	3-(N-morpholino)propanesulfonic acid	
NCS	newborn calf serum	新生仔ウシ血清
NIH	National Institute of Health:	米国国立公衆衛生研究所
PBS(-)	phosphate-buffered saline:	リン酸緩衝塩類溶液
PHA	phytohemagglutinin:	フィトヘマグルチニン
PTH	phenylthiohydantoin	フェニルチオヒダントイン
rpm	rotation per minute	
SbV	sindbis virus	
SDS	sodium dodecylsulfate:	ラウリル硫酸ナトリウム
SEA	staphylococcal enterotoxin A	
SLS	sodium N-lauroylsarcosine:	N- ラウロイルザルコシンナトリウム
SV40	simian virus 40	
TPA	12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate	
TCID ₅₀	50 % tissue culture infective dose:	50 % 組織培養感染量
Tris	tris-(hydroxymethyl)aminomethane:	トリス-(ヒドロキシル メチル) アミノメタン
TBS	Tris-buffered saline	
TPCK	N-tosyl-l-phenylalanyl chloromethyl ketone	
u	unit(s)	
VSV	vesicular stomatitis virus:	水疱性口内炎ウイルス

序 論

1、インターフェロン

多くの多細胞生物は、細菌やウイルスなどの微生物感染に対して自らの生存を維持するための防御機構を備えている。高等動物における防御機構としてはいわゆる免疫系 (Immune system) がよく知られているが、インターフェロンは、免疫系とは独立にウイルス増殖を抑制する因子として発見された(1,2)。インターフェロン (以下 IFN と略す) はウイルス感染細胞や免疫刺激を受けたリンパ球などによって生産、分泌されるホルモン様タンパク質であり、細胞に作用してウイルスが増殖できない状態 (抗ウイルス状態) に導くことによってウイルス増殖を抑制する。従って、抗体などとは違って個々のウイルスに対する特異性はない。少なくともセキツイ動物全般に存在していると考えられているが、その性質が詳しく研究されているのはヒトおよびマウスの IFN である (3~5)。一般に種特異性が高く、一部の例外を除いて異なる種の細胞に対する活性は低い (6)。

IFN は、抗ウイルス作用 (1,2)の他に、細胞増殖の抑制 (7)、抗体産生の抑制 (8)あるいは増強 (9)、マクロファージの活性化 (10,11)、ナチュラルキラー細胞活性の増強 (12)、主要組織適合抗原の増加 (13~15)、抗腫瘍細胞作用 (16~18) などの多彩な作用を示すことが知られている。その作用機構に関しては不明な点が多いが、IFN が作用した細胞では (2'-5') オリゴアデニル酸合成酵素 (19)、二重鎖 RNA 依存プロテインキナーゼ (20)、2'-ホスホジエステラーゼ (21)などの酵素が誘導されることが知られており、これらの酵素を介して引き起こされるタンパク合成の阻害が抗ウイルス状態の成立に重要な役割を果たしていると考えられている (3,5,22, 23)。

2、ヒトインターフェロンの性状と遺伝子構造

ヒトの IFN は、その抗原性に基づいて α 型、 β 型、 γ 型の 3 つのクラスに大別される (24)。IFN- α と IFN- β は、ウイルス感染や二重鎖 RNA (ポリ (I):ポリ (C) など) によって誘発され、pH2 での酸処理や SDS 処理に対して安定である。ヒト IFN- α は、センダイウイルスで誘発した末梢白血球 (25,26)やリンパ芽球様細胞 (27~29)

の培養上清からほぼ完全に精製され、分子量 15,000～24,000 の単純タンパク質で、数種類の亜種が存在することが示された。ヒト IFN- β は、二倍体線維芽細胞 (30) や株化線維芽細胞 (31) を二重鎖 RNA (ポリ (I):ポリ (C) など) で誘発することにより生産される分子量約 20,000 の糖タンパクである。1979 年以降、ヒト IFN- α , IFN- β の cDNA や染色体遺伝子が相次いでクローン化され、その塩基配列、アミノ酸配列が明らかにされた (32～50)。その結果、IFN- α 遺伝子は多数の遺伝子から成るファミリーを形成しており、それらはアミノ酸配列が相互に 1.6～13 % 異なる分子種をコードしていることが示された (35～37, 42～44, 49, 50, 53, 54)。ウイルス感染細胞から得られる IFN- α の精製標品の多様性は遺伝子が多数存在すること起因すると考えられる。これらの IFN- α 分子は、その cDNA を単離した研究グループによって、IFN- α 1, - α 2, …… (34, 35), あるいは IFN- α A, - α B, …… (36, 37) と命名されている。これらの IFN- α cDNA がコードする IFN- α 前駆体ポリペプチドは通常 189 個のアミノ酸から成るが、IFN- α 2 前駆体では 188 個 (35), IFN- α 11 前駆体では 195 個 (43) である。このうち NH₂-末端側の 23 アミノ酸残基はシグナル配列として分泌の際に切断されるので、成熟ヒト IFN- α のアミノ酸残基数は 166 個 (IFN- α 2 では 165 個, IFN- α 11 では 172 個) となる。また、IFN- β cDNA がコードする前駆体は、21 アミノ酸残基のシグナル配列と 166 アミノ酸残基の成熟タンパク質部分から成っている。IFN- β のアミノ酸配列中にはアスパラギン結合型糖鎖の結合する配列 (Asn-Glu-Thr) が存在しており、IFN- β が糖タンパクであることを裏付けている (38～41)。これに対し、ヒト IFN- α は一部の例外 (IFN- α 14, IFN- α 11 など) を除いて一般には糖鎖付加部位はない。

ヒト IFN- α 遺伝子群はその相同性に基づいて大きく 2 つのサブファミリーに分類されている。IFN- α I サブファミリーは少なくとも 15 個の遺伝子座から成り、その内 14 個は活性のある IFN- α タンパク質をコードしている。また、IFN- α II サブファミリー (42～44) は少なくとも 6 個の遺伝子座から成っているが、1 つの遺伝子 (IFN- α 11) を除いて全て偽遺伝子である。その他、何れのサブファミリーにも属さないと思われる 2 つの偽遺伝子 (IFN- α 11, IFN- α 12) も存在する (44)。ヒト以外にもマウス (51), ウシ (43) などの IFN- α cDNA がクローン化されており、やは

り複数の遺伝子があることが示されている。一方、IFN- β に関しては、最初に単離されたcDNAをプローブに用いたSouthernハイブリダイゼーションなどの結果などから、ヒト(47,48)やマウス(52)ではハプロイドあたり一個の遺伝子が存在するのみであると考えられている。これに対し最初にクローン化されたヒトIFN- β (これをIFN- β 1と呼ぶ)の他にもIFN- β 2が存在するとの主張もある(53,54)が、この分泌性タンパク質が抗ウイルス活性を有しているか否かについては疑問点もあり(55,56)、まだ一般に受け入れられるに至っていない。一方、ウシでは既に3つのIFN- β 遺伝子がクローン化されており(57)、ウシ、ウマ、ブタなどでは少なくとも5個のIFN- β 遺伝子が存在することが示唆されている(59)。

IFN- α と- β はその一次構造に高い相同性があり、アミノ酸配列において29%、塩基配列のレベルでは45%もの一致が見出される(60)。また、IFN- α 遺伝子群、IFN- β 遺伝子には介在配列(イントロン)がなく、いずれも第9染色体の短腕上に位置している(60,61)。さらに、IFN- α 、- β 両遺伝子の転写開始部位より上流約130塩基対の領域にはタンパク質コード領域よりもさらに高い相同性(55%の一致)が存在する(62)。これらの知見から、IFN- α 、- β 遺伝子は少なくとも2~3億年前に共通の祖先遺伝子から遺伝子重複によって分岐し、 α 型はその後さらに多数の遺伝子に分岐したのであろうと推定されている(44,214)。

IFN- γ は、末梢血リンパ球や非リンパ球をコンカナバリンA(concanavalin A; 以下Con A)、フィトヘマグルチニン(phytohemagglutinin; 以下PHA)(63)、ブドウ状球菌エンテロトキシンA(*staphylococcus aureus* enterotoxin A; 以下SEA)(64)などのT細胞マイトゲンで刺激した場合や、感作リンパ球を抗原で刺激した場合に産生されるリンホカインのひとつであり、免疫インターフェロンとも呼ばれている(3)。IFN- α 、 β と異なり、一般に酸処理やSDS処理で失活しやすい。IFN- γ 産生に適した株化培養細胞はあまり多くなく、Nathanらの報告したTリンパ芽球様細胞株であるMo細胞(65)やヒトレトロウイルスでTリンパ球をトランスホームして得られたTCL-Fuj細胞(66,67)が知られているのみである。

ヒト IFN- γ には、少なくとも 3 種類の分子種が存在しており、それぞれ SDS-電気泳動においておよそ 25,000 (25K) , 20,000 (20K) , 15,000 (15K) の相対分子量を示す (68~73)。一般には 25K 分子および 20K 分子が主成分であり 15K 分子は存在してもごく微量のようである (71,73)。この多型性は、遺伝子が複数存在するためではなく、糖鎖の数によると考えられる。すなわち、25K 分子には糖鎖が 2 個、20K 分子には 1 個付加していることが知られている (72)。15K 分子はおそらく糖鎖を持たない分子であろう (71)。

ヒト IFN- γ の cDNA および遺伝子 DNA は Gray ら (74)をはじめいくつかの研究グループによってクローン化され、その全塩基配列が明らかにされた (74~79)。その cDNA は 166 個のアミノ酸配列から成る IFN- γ 前駆体ペプチド鎖をコードするものであった。精製ヒト IFN- γ の NH₂-末端アミノ酸配列との比較により、前駆体タンパクのはじめのメチオニンから 23 番目のシステインまでがシグナルペプチドであり、成熟 IFN- γ タンパク質のポリペプチド鎖は 143 アミノ酸残基から成ることが示された (72)。また、アスパラギン結合型糖鎖が結合し得る配列 (Asn-X-Ser or Thr) は 2箇所見出された。しかし、cDNA の成熟 IFN- γ 領域を大腸菌で発現させて活性のある IFN- γ を生産できることから、IFN- γ の活性発現において糖鎖部分は必要ではない (74,77)。ヒト第 12 染色体の長腕上に存在する IFN- γ 遺伝子は、4 つのエクソンと 3 つのイントロンから構成されており、約 5 キロ塩基対の長さに渡っている (61,78,79)。IFN- γ の塩基配列、アミノ酸配列には IFN- α , $-\beta$ との相同性はほとんど認められない (74,78)。また、イントロンがあることや遺伝子が位置する染色体が異なっていることから、IFN- γ は、その遺伝子の由来もタンパク構造も他の 2 者とは大きく異なっていると考えられる。細胞膜表面に存在する IFN レセプターに関しても、IFN- α と $-\beta$ が共通のレセプターに結合するのに対し、IFN- γ はこれとは別のレセプターに結合すると考えられている (80~83)。

本研究では、まず、ヒト IFN- γ の cDNA をクローン化して塩基配列を決定し、Devos らの報告した配列 (76)と一致することを確認した。その内容は、「結果」の第一部に示した。次いで、この cDNA を用いて、ヒト IFN- γ の遺伝子工学的生産法

および遺伝子発現機構の研究を行った。以下に、筆者がこれらの研究を行った研究背景と目的について述べる。

3、組み換えDNA技術によるインターフェロンの生産

インターフェロンの分子構造や多面的な生理活性を詳細に解析するためにはIFNの大量生産と高度精製を行う必要がある。しかし、IFNはタンパク量としては *in vivo* でも *in vitro* でも極めて微量にしか産生されず、培養細胞で生産する方法には多くの困難が伴う。そのため、遺伝子操作の手法を用いてIFNを大量に生産することが試みられてきた。すでに、クローン化したヒトやマウスのインターフェロン遺伝子を大腸菌 (*Escherichia coli* K-12 株) (5,32,39,74,84~87), 枯草菌 (*Bacillus subtilis*) (88), 酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) (89)などの微生物に導入して大量生産に成功した例が報告されている。しかし、このような組み換えIFN分子は、必ずしも本来のIFN (これを以後天然IFNと呼ぶことにする) と同じものではない。先にのべたように、ヒトIFN- β , IFN- γ は糖タンパクであるが、細菌によって合成されたIFN- β , - γ には糖鎖が付いていないと考えられている(86,87)。また、IFNの前駆体タンパク質を大腸菌で発現させてもシグナルペプチドの正確な切断や細胞外への分泌は行われなため、通常はIFN遺伝子(あるいはcDNA)のシグナルペプチド部分を除いた成熟IFN部分の直前に開始コドン(ATG)を接続し、成熟IFN分子を細胞内に蓄積させる方法がとられている(84~87)。このNH₂-末端のメチオニン残基は大腸菌に存在する切断酵素で除去される場合とそうでない場合がある(86,87)。また、大腸菌で生産したヒトIFN- γ では、COOH-末端側の12個のアミノ酸配列が欠損した分子が存在するとの報告もある(90)。大腸菌で生産したIFN- β , - γ も抗ウイルスその他の活性を有することから、糖鎖部分は活性発現に必須ではないと考えられるが、立体構造、抗原性、薬力学的性質などが天然IFNと異なっている可能性は十分考えられる。実際、大腸菌由来のヒトIFN- β やIFN- γ と天然のそれらとで抗IFN抗体に対する反応性に違いが生じる例が報告されている(91,92)。

これらの問題点を解決する手段のひとつとして、哺乳類の培養細胞にIFN遺伝子

を導入して発現させることが考案された。しかし、動物培養細胞は大腸菌などに比べて増殖速度が著しく遅い上にタンパク合成量も低いため、大量生産を行うためには遺伝子発現量の高い系を用いる必要がある。Haynes と Weissmann (93) および Scatchell ら (94) は、ヒト IFN 遺伝子をハムスター由来の CHO 細胞 (chinese hamster ovary cell) に導入して IFN の大量生産を試みた。この場合、Simian Virus 40 (SV40) の初期プロモーターで IFN 遺伝子を発現させ、さらに、その遺伝子の細胞内コピー数を増幅させる工夫 (95) を組み合わせることで高い IFN 産生量を実現している。高い生産量を得るためには、このように転写活性の高いプロモーターを使うことや遺伝子量 (コピー数) を高めることが重要であろう。

筆者らは、本研究において、ウシパピローマウイルス 1 型 (bovine papilloma virus-1) の遺伝子を発現用ベクターに用い、マウス細胞でヒト IFN を大量生産することを試みた。ウシパピローマウイルス 1 型 (以下 BPV と略す) はパポバウイルスに属し、ウシにいぼ (wart) を作る DNA 腫瘍ウイルスである (96)。そのゲノムは 7945 塩基対の環状二本鎖 DNA から成っている (97)。BPV を培養細胞で増殖させた例は現在のところ知られていないが、齧歯類の株化培養細胞であるマウス C127 細胞, NIH3T3 細胞, ラット FR3T3 細胞などに感染させると細胞をトランスホームすることができる (98~100)。トランスホームした細胞は、接触阻止効果 (contact inhibition) や培養基質要求性 (anchorage dependency) を失い、腫瘍原性を有するようになる (101,102)。他の腫瘍ウイルスによって細胞をトランスホームした場合には、一般にウイルスゲノムは宿主細胞の染色体 DNA に組み込まれて存在する。ところが BPV でトランスホームした細胞では、ウイルス DNA は宿主染色体に組み込まれずに染色体外の小環状 DNA (エピゾーム) として存在するというユニークな性質がある (99,103)。細胞のトランスホメーションおよびエピゾーム状態の確立と維持は、BPV の全ゲノムの 69% に相当する約 5.4kb の DNA 断片でも可能である (101,104)。この BPV エピゾームは細胞当たり 10~150 コピーで安定に保持される (99,104) ことから、大量生産を目的とする発現ベクターとして有望であると思われる。筆者らは、ヒト IFN- γ および IFN- α 5 の cDNA を SV40 初期プロモーターに接

続した雑種遺伝子を BPV-DNA に組み込み、これをマウス C127 細胞に導入してヒト IFN を構成的に産生する細胞株を確立した(105)。こうして生産した IFN- γ は、糖鎖を有する点や NH₂-末端アミノ酸配列などにおいて天然のヒト IFN- γ と同様の性状を示した。これらの結果は、「結果」第二部に示した。

4. DNAメチル化機構と遺伝子発現

IFN- γ 遺伝子は T リンパ球で特異的に発現する遺伝子であるが、その組織特異性を決定するメカニズムに関する分子生物学的知見は乏しい。真核生物において遺伝子の発現がどのように制御されているのかということは高等動物のホメオスタシスや発生、分化を分子レベルで理解する上で重要な問題であり、現在、最も活発に研究されている分野のひとつである。遺伝子発現の制御には、転写、RNA プロセッシング、翻訳などの調節を司る遺伝子情報としての DNA 一次構造（塩基配列）が重要な役割を担っていることが明らかにされているが、近年、多細胞生物の組織特異的あるいは分化段階特異的な遺伝子発現には、クロマチン構造や DNA のメチル化、脱メチル化機構(106～110)が関与していることが指摘されるようになった。

セキツイ動物では全ゲノム DNA のシトシン残基の 2～7 % はその 5 位がメチル化された 5-メチルシトシンに転化していることが知られている(109)。5-メチルシトシン残基 (m⁵C) は、通常、その 3' 側にグアニン残基 (G) を伴っており、他の塩基 (A, T, C) が続く場合はほとんどない。その場合、メチル化は 5'...CG...3' (従ってその相補鎖は 3'...GC...5') という配列をもつ二重鎖 DNA の両鎖のシトシン残基に同時に起きており (図 1)、全ゲノム中の CG 配列の 70% 程度はこのようにメ

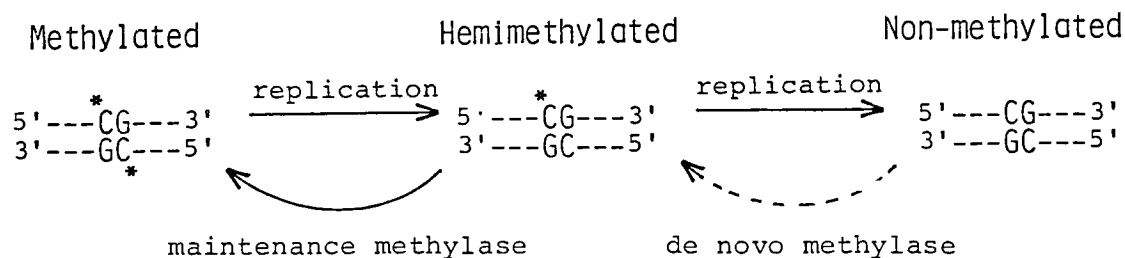


図 1. セキツイ動物 DNA におけるシトシン残基のメチル化状態の変化
*C は、5-メチルシトシン残基を表す。

チル化された状態にある(109)。DNA が複製して新たに合成されたDNA 鎖のシトシン残基にはメチル基は存在しないが、通常はこのヘミメチル化状態を認識するメインテナンスメチラーゼ (maintenance methylase) によって速やかにメチル基が導入される(111~113)。これにより親細胞のメチル化パターンが娘細胞にも保存されることになる。しかし、何らかの機構によってメインテナンスメチラーゼの作用が阻害されるとメチル化されていないCG 配列が生じることになる。また逆に、もともとメチル化されていなかったCG 配列に *de novo* メチラーゼが作用すると新たにメチル化された配列 (m^5 CG) が生じる。実際、生殖細胞と種々の分化した細胞ではゲノム上のいろいろな遺伝子座においてCG 配列のメチル化パターンが異なっている(109,114)。 β -グロビン(115)、メタロチオネイン(116)、ニワトリヴィテロジェニン(117,118)、レトロウイルス(119,120)、アルブミン(121)など多くの遺伝子において、その遺伝子領域内のCG 配列のメチル化の程度が低い状態 (undermethylation, 以下低メチル化状態と呼ぶ) とその遺伝子の転写活性に相関性があることが指摘されている。すなわち、これらの遺伝子では、これを発現していない組織の細胞ではその遺伝子近傍のCG 配列が高度にメチル化されており、特異的に発現している組織の細胞では低メチル化状態にある。また、細胞をDNA メチル化の阻害剤である5-アザシチジン存在下で培養することによってDNA 低メチル化状態を引き起こすと、もともと発現していなかった遺伝子が発現するようになることも見出されている(116,119,122~125)。これらの観察から、DNA 低メチル化状態は遺伝子が転写されるための必要条件であろうと考えられるようになった。さらに、細胞に外からDNA を導入して発現させる実験においても遺伝子を *in vitro* でメチル化しておくとその発現が抑制されるという結果(126~128)も報告されており、DNA メチル化によって遺伝子が不活性な状態になるという考えを支持している。

DNA メチル化がどのような機構で転写制御に関与し得るのかについては今のところ不明であるが、DNA の二次構造の変換 (B型からZ型への変換) を通して転写に影響を与えることが示唆されており(129)、クロマチン構造の変化に関係している可能性も考えられる。しかし、組織特異的遺伝子発現と低メチル化状態に相関性が見出せない遺伝子も知られている(130,131)。また、マウスの主要組織適合抗原

の一つであるH-2K 遺伝子は通常これを発現している細胞でも高度にメチル化されているが、5-アザシチジンを作用させて低メチル化状態にすると先に挙げた例とは逆に転写が抑制されるという報告もある(132)。DNA メチル化の果たす機能は全ての遺伝子に対して普遍的ではなく、遺伝子の種類によって異なっているのかもしれない。

先に述べたように、IFN- γ は感作抗原やマイトゲンの刺激されたTリンパ球によって産生される。IFN- γ 遺伝子の発現は主として転写段階で制御されている(133,134)が、Tリンパ球に特異的で、かつまた誘導刺激に依存した発現をコントロールする機構は不明である。Sugamura らによって確立されたヒトTリンパ芽球細胞株であるTCL-Fuj 細胞(66)はIFN- γ 生産能が安定している均一な細胞集団なので、IFN- γ の遺伝子発現制御を研究するためのよい系になると考えられる(67)。

筆者らは、本研究において、IFN- γ 遺伝子の発現制御にDNA メチル化機構が関与しているかどうかを調べるために、種々のヒト正常細胞や株化培養細胞のIFN- γ 遺伝子近傍のCCGG 配列におけるメチル化パターンを解析した(135)。その結果は、「結果」第三部に示した。

材 料 と 方 法

1. 試薬類

Eagle の最小必須培地 (Eagle's minimal essential medium; 以下MEM) , メチオニン不含MEM, およびDulbecco 変法Eagle 培地 (Dulbecco's modified Eagle's medium; 以下DMEM) は日水製薬から、RPMI-1640 培地およびウシ胎児血清 (fetal calf serum; 以下FCS) はGibco 社から、新生仔ウシ血清 (newborn calf serum; 以下NCS) はミドリ十字社から、それぞれ購入した。リン酸緩衝塩類溶液 (phosphate buffered saline; 以下PBS(-)) は、Dulbecco のPBS(68)から $MgCl_2$ と $CaCl_2$ を除いた処方に従って調製した。仔ウシ血清 (calf serum; 以下CS) は、滋賀県食肉衛生検査所より供与された仔ウシ血液から調製した。ブドウ状球菌エンテロトキシンA (SEA) は岩手大学農学部の商品川邦汎教授から、12-O-テトラデカノイルフォルボル 13-酢酸 (12-O-tetra-decanoylphorbol 13-acetate; 以下TPA) は京大ウイルス研究所日沼頼夫教授から、それぞれ供与していただいた。チオシアン酸グアニジン (guanidinium thiocyanate; 以下GTC) はFluka から、ATP, ADP, dATP, dCTP, dGTP, dTTP, ポリ(A) はヤマサ醤油から、制限エンドヌクレアーゼなどの酵素類は宝酒造, 東洋紡, ファルマシア, ベーリンガーマンハイム山之内, P. L. biochemicals, Promega Biotec, Bethesda Research Laboratories, New England BioLabs 等から購入した。トリ骨髄芽球症ウイルス逆転写酵素は、J. W. Beard 博士 (Life Sciences社) の調製したものを生化学工業より供与していただいた。バクテリオファージ λ Charon 4A-ヒト染色体DNA ライブラリー(137)は、T. Maniatis 博士らが作製したものを、東大医科学研究所の長田重一博士を介して供与していただいた。 $[^{32}P]$ 無機リン酸 (比活性 8,000 Ci/mmol) と $[^{35}S]$ メチオニン (比活性 400 Ci/mmol) はアマシャムから、 $[\alpha -^{32}P]$ dCTP (比活性 3,000 Ci/mmol) はアマシャムまたはNew England Nuclear から購入した。CPG-10 (controlled-pore glass; CPG-10 350 オングストローム 20/200メッシュ) はフナコシ薬品から、DEAE-トヨパール650 は東洋曹達工業から、Con A-Sepharose 4B およびSephacryl S-200 はファルマシアから、AquacideII はCalbiochem-Behring から、それぞれ購入した。抗ヒトIFN- γ モノクローナル抗体カラム(73)は、当研究

室の宮田敬三氏が作製したものを使用した。ウサギ抗ヒト IFN- α / β 抗体は National Institute of Health (NIH) から、ウサギ抗ヒト IFN- α 抗血清(138)は東京都臨床医学総合研究所の米原伸博士から、ウサギ抗ヒト IFN- γ 抗体は Leuven 大学 Marc DeLey 博士から、それぞれ供与していただいた。大腸菌で生産した組み換えヒト IFN- γ の精製標品は、Zürich 大学 C. Weissmann 博士から供与していただいた。

2、プラスミド DNA

pBR322(139), pBR327(140), pBR322-SV40(map units 0.71~0.86)(141), pBR322-SV40(map units 0.19~0.32)(141), Hif-2h(32)などのプラスミドは、東京大学医科学研究所の長田重一博士より供与していただいた。プラスミド pKCR (142)は R. Breathnach 博士から、プラスミド pdBPV-1(104)は National Cancer Institute の Peter M. Howley 博士から、それぞれ供与していただいた。プラスミド JW151(143)は、東京大学薬学部の帯刀益夫博士を通じて Yale 大学 B. G. Forget 博士から供与していただいた。

3、ヒトリンパ球および子宮組織

ヒト脾リンパ球は、兵庫医科大学病院において肝硬変あるいは胃癌患者の外科手術の際に摘出された脾臓より当該患者の承認を得て兵庫医科大学にて調製したものを使用させていただいた。脾リンパ球の精製は、Bäyum らの方法(144)を一部改変して以下のように行った。脾臓を 0.1 %ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin; 以下BSA) と 2 units/ml のヘパリンを含む PBS(-)中で氷冷下細切した後ピンセットでほぐし、金属ふるいに通して細胞浮遊液を得た。200 x g, 10 分間の遠心操作によって細胞を集め、上記の緩衝液に再浮遊した。50 ml の遠心管に 6.5 %フィコール, 9.5 %イオタラム酸ナトリウムを含む PBS(-) (比重 1.083) を 15 ml 入れ、この上に 30 ml の細胞浮遊液を重層して 20 °Cで 400 x g, 30 分間の遠心操作を行った。中間層のリンパ球画分を集め、PBS(-)で 3 回、10 %の FCS を含む RPMI-1640 培地で 1 回洗浄した後、IFN 産生に用いた。

DNA メチル化の解析に用いたヒト末梢血リンパ球は、健常成人の末梢血から分離した buffy coat 画分を上記のフィコール-イオタラム酸ナトリウム液を用いた遠心操作にかけて精製し、これをさらに Nakane と Miyagawa の方法(145)に従って以下の3つの細胞画分に分画したものをを用いた。末梢血リンパ球を 1×10^7 cells/ml の濃度で 10 % FCS を含む RPMI-1640 培地に浮遊させ、これを 30 ml ずつ 14 cm の培養用プラスチックペトリ皿に入れ、37 °C の CO₂ インキュベーターで 2 時間培養した。培養後、ペトリ皿に付着しなかった細胞を培地ごと新しいプラスチックペトリ皿に移し、再び 37 °C で 2 時間培養した。非付着細胞を除いた後、全てのペトリ皿を PBS(-) で洗浄し、残った付着細胞をラバーポリスマンで集めてプラスチック付着細胞画分とした。非付着細胞は、S-(2-aminoethyl)isothiuronium bromide で処理したヒツジ赤血球を用いた E-ロゼット形成法(146)によって T 細胞画分と非 T 細胞画分に分画した。

子宮組織としては、子宮筋腫患者の外科手術の際に摘出された子宮を当該患者の承認を得て使用させていただいた。

4、株化培養細胞

ヒト胎児由来 GM2504 細胞(第 21 番染色体 3 倍体)は、塩野義製薬より供与されたものを、10 % FCS を含む MEM で培養、継代した。ヒト羊膜由来 FL 細胞、ヒト鼻咽腔癌由来 KB 細胞およびマウス L 細胞は、3 ~ 5 % の NCS または CS を含む MEM で培養、継代した。マウス C127 細胞(147)、C127 細胞由来のトランスホーム細胞およびサル COS-7 細胞(148)は、特に断わらない限り、10 % FCS を含む DMEM で培養、継代した。T リンパ芽球様株化培養細胞である TCL-Fuj 細胞、TCL-Tan 細胞、TCL-Kan 細胞、TCL-Haz 細胞(66)は京大ウイルス研究所日沼頼夫博士から、また TCL-Fuj 由来の TCL-Fuj2M 細胞、TCL-FujH1 細胞、TCL-FujH2 細胞、TCL-FujL1 細胞(149)および前骨髄球様白血病細胞株(promyelocytic leukemia cell line)である HL60 細胞(150)は神戸市環境保健研究所の松山雅子博士から、それぞれ供与していただいた。これらの造血系株化培養細胞は、10 % FCS を含む RPMI-1640 培地で培養、継代した。

5. ウイルス

Encephalomyocarditis virus (以下EMCV) は、癌研究会癌研究所の谷口維紹博士より供与していただいたものを、マウスL細胞で継代して用いた。Mengo virus は、東大医科学研究所の長田重一博士より供与していただいたものを、マウスL細胞で継代して用いた。Sindbis virus (以下SbV) および Vesicular stomatitis virus; New Jersey 株 (以下VSV) は、当研究室保有のものをハムスターBHK細胞で継代して用いた。

6. インターフェロンの力価測定

ヒトIFN活性は、GM2504細胞とEMCV, FL細胞とMengo virus, あるいはFL細胞とSbVなどの細胞-ウイルス系を用いて、細胞変性効果(cytopathic effect; 以下CPE)阻止法(151)によって測定した。マウスIFN活性は、L細胞とVSVを使って同じくCPE阻止法により測定した。

$1 \sim 3 \times 10^5$ cells/ml の細胞を96ウェルマイクロプレートの各ウェルに0.1 ml ずつ入れ、これを37℃の5%CO₂インキュベーターで培養した。細胞接着後、培養液を除き、血清濃度を0.5~1.0%に下げた培地で段階希釈した測定試料をウェルあたり0.1 ml 入れ、12~24時間培養した。培養後、無血清培地あるいは0.5%の血清を含む培地で100~1,000 TCID₅₀になるように希釈したウイルス懸濁液を0.05~0.1 ml 加え、さらに36~60時間培養した。CPEを検鏡またはクリスタルバイオレット染色によって評価し、約50%の細胞にCPEがあらわれる希釈点をもってIFN力価=1実験単位/ml (1 unit/ml; 以下u/mlと表す)とした。組み換えヒトIFN- α 5, IFN- γ の力価は、NIHのヒトIFN- α 参照試料(G-093-901-527)およびヒトIFN- γ 参照試料(Gg23-901-530)を用いてそれぞれ補正し、国際単位(International units; 以下IU)で表した。マウス細胞に対する抗ウイルス活性の力価も、NIHのマウスI型IFN参照試料(G-002-904-511)で補正して国際単位(IU/ml)で表現した。

7、RNA の抽出

細胞からのRNA の抽出は、Chirgwin らの方法(152)に従って行った。ヒト脾リンパ球をSEA で刺激して得たIFN 産生細胞(湿重量約5 g, 1×10^{10} 細胞)に60 ml のGTC 溶液〔4 M GTC, 0.5 % N-ラウロイルサルコシナトリウム(sodium N-lauroylsarcosine; 以下SLS), 25 mM クエン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.0), 0.1 M 2-メルカプトエタノール(2-mercaptoethanol), 0.1 % アンチフォームA を含む〕を加え、直ちにダウンスホモゲナイザーで細胞を破碎した後、10,000 x g, 10 分間の遠心操作で細胞残渣を除いた。容積38.5 ml の超遠心管に5.7 M CsCl, 0.1 M EDTA (pH 7.0) を13 ml 入れ、この上に上記細胞抽出液を25 ml 重層した。Beckman 社製SW27 ローターを用いて20 °Cで24,000 rpm, 18 時間の遠心操作を行い、全RNA の沈澱を得た。沈澱を7 ml のTNE〔50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM NaCl, 5 mM EDTA を含む〕に溶解し、これと等量のフェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール混液(25:24:1, 予めTNE で飽和させたもの)を用いてフェノール抽出操作を3 回繰り返した後、エタノール沈澱操作によってRNA を回収した。

8、ポリ(A)+RNA の精製と分画

RNA 沈澱を9 ml の10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 2 mM EDTAに溶解し、70 °Cで3 分間加熱した後、氷水で急冷した。これに1 ml の4 M NaCl, 1 % SLS 液を加え、オリゴ-(dT) セルロース(153)のカラム(1.5 ml)に吸着させた。10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.4 M NaCl, 1 mM EDTA, 0.1 % SLS でカラムを洗浄して非吸着画分を除いた後、10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA, 0.1 % SLS によって吸着したポリ(A)+RNA を溶出した。得られたポリ(A)+RNA を分子量によって分画するためにショ糖密度勾配超遠心を行った。70 °Cで3 分間の熱処理後急冷したポリ(A)+RNA (0.1 ml) を5~25 % (w/v) の直線ショ糖密度勾配水溶液〔5 ml; 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.2 M NaCl, 1 mM EDTA, 0.1 % SLS を含む〕に重層し、日立RPS-40 ローターを用いて4 °Cで26,000 rpm, 19 時間の遠心操作を行った。遠心後、0.25 ml ずつ20 画分に分画し、エタノール沈澱操作によって

各画分のポリ(A)+RNAを回収した。

9、アフリカツメガエル卵母細胞によるIFN- γ mRNAの活性測定

IFN- γ mRNAの生物活性は、アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) 卵母細胞のタンパク合成系を利用するGurdonらの方法(154)に従って測定した。ポリ(A)+RNA沈澱を40 μ lの水に溶解し、このうち2 μ lを微量注射器に取って約50個の卵母細胞(stage V-VIのもの)に約40 nlずつ注入した。この卵母細胞を0.15 mlの変法Barth培地(155)〔7.5 mM Tris-HCl (pH 7.6), 88 mM NaCl, 1 mM KCl, 0.33 mM Ca(NO₃)₂, 0.41 mM CaCl₂, 0.82 mM MgSO₄, 2.4 mM NaHCO₃, 18 units/ml ペニシリンG, 18 μ g/ml ストレプトマイシン, 40 μ g/ml ゲンタマイシンを含む〕に浮遊させ、24 °Cで48時間培養した後、培養上清中のIFN活性を測定した。

10、二重鎖cDNAの合成とcDNAライブラリーの作製

cDNAライブラリーは、以下の2つの異なる方法によって作製した。

方法I. ポリ(A)+RNAを鋳型としてEfstratiadisらの方法(156)で二重鎖cDNAを合成した後、Hoeijmakersらの方法(157)に従って次のようにcDNAライブラリーを作製した。まず、二重鎖cDNAにオリゴ-(dC)鎖を付加し、プラスミドpBR322を制限酵素PstIで切断してオリゴ-(dG)鎖を付加したもの(158)とアニールさせて組み換えプラスミドを作製した。次いで、Van den Bergらの方法(159)に従ってカルシウム処理を行った大腸菌 \times 1776株(160)をこのプラスミドで形質転換(157)し、テトラサイクリン耐性の形質転換株から成るcDNAライブラリーを得た。

方法II. ポリ(A)+RNAを鋳型として、OkayamaとBergの方法(141)に従って二重鎖cDNAを含む組み換えプラスミドを作製した。Van den Bergらの方法でカルシウム処理した大腸菌SK1592株(161)をこのプラスミドで形質転換し、アンピシリン耐性の形質転換株から成るcDNAライブラリーを得た。

11. 合成オリゴヌクレオチドおよび二重鎖DNAの³²P標識

Gray らによって決定されたヒト IFN- γ cDNA の塩基配列 (74) の一部に相当するオリゴデオキシリボヌクレオチド (14 量体; 5'dAAACAGCATCTGAC) は、松本時光氏 (MS 機器) に合成していただいた (図 2)。まず [γ -³²P]ATP を Kennedy の方法 (162) に従って [³²P]無機リン酸と ADP から酵素的に合成し、これを用いてオリゴヌクレオチドの標識を行った。50 mM Tris-HCl (pH 9.0), 10 mM MgCl₂, 5 mM ジチオトレイトール (dithiothreitol), 0.1 mM スペルミジン, 0.1 mM EDTA, 300 μ Ci の [γ -³²P]ATP (比活性約 8,000 Ci/mmol), 15 pmol の合成オリゴヌクレオチドを含む反応液 (20 μ l) に 6 units の T4 ポリヌクレオチドキナーゼを加えて、37 °C で 30 分間反応させた。生成した 5'-³²P-標識オリゴヌクレオチドをフェノール抽出操作および Sephadex G-50 のゲルろ過によって精製した後、コロニーハイブリダイゼーションのプロープに用いた。

二重鎖 DNA は、ニックトランスレーション法 (169) によって [α -³²P]dCTP で標識し、比活性 2 ~ 4 $\times 10^8$ dpm/ μ g の標品を得た。

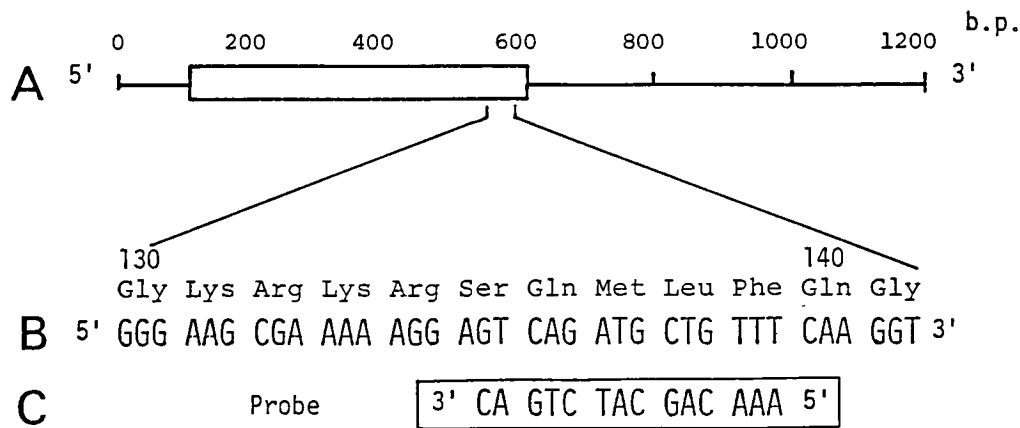


図 2. 合成オリゴヌクレオチドの塩基配列

(A); Gray らによって決定されたヒト IFN- γ cDNA (74) の概略図を示す。白枠部分は、タンパク質コード領域を表す。(B); cDNA の塩基配列 (+鎖) の一部とその部分にコードされるアミノ酸配列。(C); 合成オリゴヌクレオチド (14 量体) の塩基配列。

12. コロニーハイブリダイゼーション

ニトロセルロースフィルター上に形質転換株のコロニーを形成させ、Hanahan と Meselson の方法 (163) に従ってレプリカフィルターの作製とコロニー中の DNA の固定化 (コロニーフィルターの作製) を行った。

コロニーハイブリダイゼーションによる cDNA のスクリーニングは、プローブの種類に応じて以下の 2 つの方法のいずれかでを行った。

方法 I、オリゴヌクレオチドプローブの場合 標識オリゴヌクレオチドをプローブに用いる場合は、Wallace らの方法 (164) を一部改変して次のようにハイブリダイゼーションを行った。まず、数枚のコロニーフィルターを、フィルター 1 枚につき 4 ml のハイブリダイゼーション溶液 I (90 mM Tris-HCl (pH 7.5) , 0.9 M NaCl, 6 mM EDTA, 5 x Denhardt's (1 x Denhardt's は、0.02 % フィコール, 0.02 % ポリビニルピロリドン, 0.02 % BSA である (165)) , 0.5 % SDS, 100 μ g/ml アルカリ変性大腸菌 DNA を含む) に浸し、55 $^{\circ}$ C で 6 ~ 8 時間のプレハイブリダイゼーションを行った。次に、 32 P-標識オリゴヌクレオチド (比活性 3×10^6 dpm/pmol) を 0.2 pmol/ml になるように加えたハイブリダイゼーション溶液 I (フィルター 1 枚につき 0.8 ml) にこのフィルターを浸し、31 $^{\circ}$ C、34 $^{\circ}$ C または 37 $^{\circ}$ C で 20 時間保温した。ハイブリダイゼーション後のフィルターを、90 mM クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) , 0.9 M NaCl を含む洗浄液 500 ml ずつを用いて、まず 0 $^{\circ}$ C で 3 回、次いでハイブリダイゼーションの時と同じ温度で 3 回、それぞれ 5 分間ずつ洗浄した。フィルターを室温で風乾し、X 線フィルムと増感スクリーンを重ねて 1 ~ 2 日露出した。

方法 II、ニックトランスレーションで標識した DNA プローブの場合 Hanahan と Meselson の方法 (163) に従って、次のようにハイブリダイゼーションを行った。コロニーフィルターを、フィルター 1 枚につき 3 ml のプレハイブリダイゼーション溶液 II (4 x SET (1 x SET は、30 mM Tris-HCl (pH 8.0) , 150 mM NaCl, 1 mM EDTA である) , 5 x Denhardt's, 0.5 % SDS, 0.2 mg/ml アルカリ変性大腸菌 DNA を含む) に浸し、65 $^{\circ}$ C で保温した。12 時間後、フィルターをハイブリダイゼーション溶液 II (4 x SET, 1 x Denhardt's, 0.5 % SDS, 0.2 mg/ml アルカリ変性

大腸菌DNA, $4 \sim 7 \times 10^5$ cpm/ml ^{32}P -標識DNA] (フィルター 1 枚につき 0.8 ml) に移し、65 °C で約 20 時間保温した。ハイブリダイゼーション後のフィルターは、500 ml の 1 x SET, 0.5 % SDS を用いて室温で 10 分間の洗浄を 1 回, 500 ml ずつの 2 x SET, 0.5 % SDS を用いて 68 °C で 30 分間の洗浄を 4 回, 1000 ml の 3 mM Tris (Trizma base; Sigma) を用いて室温で 1 時間の洗浄を 1 回行ったのち室温で風乾し、X線フィルムと増感スクリーンを重ねて -80 °C で 1 ~ 2 日露光した。

13、DNA の調製と制限酵素反応

大腸菌DNA はMarmur の方法(166)に従って、プラスミドDNA はWilkie らの方法 B (167)に従って、それぞれ調製した。ヒトその他の動物の組織あるいは培養細胞の全細胞内DNA は、Gross-Bellard らの方法(168)に従って調製した。制限酵素によるプラスミドDNA の切断反応は、通常、酵素を購入した会社の指示に従って行い、反応後、一部をアガロースゲル電気泳動にかけることによって完全に切断されていることを確認した。Southern 解析のための全細胞内DNA の制限酵素切断の場合は、次のように反応を行った。0.05 mg/ml のDNA を含む指定の反応液 (0.2~0.8 ml) にDNA 1 μg あたり 0.5~4.0 units の制限酵素を加え、よく混合してからその一部 (20 μl ; 1.0 μg のDNA を含む) を分取し、残りを指定の温度で 10~15 時間反応させた。分取した反応液は、1.0 μg のバクテリオファージ λ cI857 S7 株のDNA を加えたのち同じ温度、時間で反応させた。分取した反応液に加えた λ ファージDNA が完全に切断されていることをアガロースゲル電気泳動で確認することをもって、全細胞内DNA も完全に切断されていると判断した。複数の酵素で切断する場合は、適宜反応液の組成を変えながら逐次的に反応を行った。

14、DNA のアガロースゲル電気泳動とこれによるDNA 断片の精製

DNA のアガロースゲル電気泳動は、特に断わらないかぎり、TAE 緩衝液 [50 mM Tris- 酢酸 (pH 7.8) , 2 mM EDTA, 0.5 $\mu\text{g/ml}$ エチジウムブロマイドを含む緩衝液] を用いて 0.8~1.5 % アガロース (Sigma, TypeII agarose) を含むゲルを作製

し、同緩衝液を電解液として 5~10 V/cm の定電圧で泳動を行った(169)。

アガロースゲル電気泳動によってDNA断片を精製する場合には、上記のアガロースの代わりに低融点アガロース (Bio-Rad, Agarose Low Gel Temperature) を用いてゲルを作製し、Weislander の方法(170)に従ってDNAを分離、精製した。

15、DNA塩基配列の決定

塩基配列の決定は、DNA断片をファージM13 mp8 株あるいはmp9 株(172)の複製II型DNA (replicative form II) にクローニングしたのち、M13 シーケンスキット (宝酒造) を用いて、ジデオキシ法(171)で行った。

16、組み換えプラスミドの構築

I、プラスミドpdKCR- γ 、pdKCR- α 5の構築 プラスミドpdKCR- γ およびプラスミドpdKCR- α 5は、Breathnach らが開発した真核生物発現プラスミドpKCR (142)をベースにして次のように構築した(図3)。まず、プラスミドpKCRの2個のEcoRI 部位のうちウサギ β -グロビン遺伝子内にあるEcoRI 部位を欠失させ、さらにこのプラスミドの2.96 キロ塩基対 (kilobase-pair; 以下kb と略) のPstI-SalI 断片部分をプラスミドpML1 の1.59 kb PstI-SalI 断片と置換することによって、新たなプラスミド(pdKCR)を作製した。次いで、このプラスミドpdKCRをBamHI で切断したのちウシ小腸アルカリ性ホスファターゼで末端のリン酸基を除去したDNA断片と、ヒトIFN- γ cDNA の0.84 kb Sau3AI 断片(図7B)あるいはヒトIFN- α 5 染色体遺伝子(50) (長田重一氏所有) の1.8 kb BglIII 断片とをT4 DNA リガーゼで接続し、これを用いて大腸菌HB101 株(169)の形質転換を行った。アンピシリン耐性形質転換株の数個のコロニーからそれぞれ少量のプラスミドをHolmes らの方法(172)で調製し、種々の制限酵素による切断断片をアガロースゲル電気泳動で解析することによってIFN- γ あるいはIFN- α 5 が目的の方向に挿入されているもの (SV40 の初期プロモーターの転写方向とIFN の翻訳配列の向きが一致しているもの) を同定して、それぞれプラスミドpdKCR- γ 、pdKCR- α 5 とした。

II、プラスミドpFN γ 、pFN α 5の構築 プラスミドpFN γ およびpFN α 5 は、

プラスミド pdKCR- γ あるいは pdKCR- α 5 とプラスミド pdBPV-1(104) から、次のように構築した (図3)。まず、pdKCR- γ , pdKCR- α 5 を *Eco*RI で切断し、DNA ポ

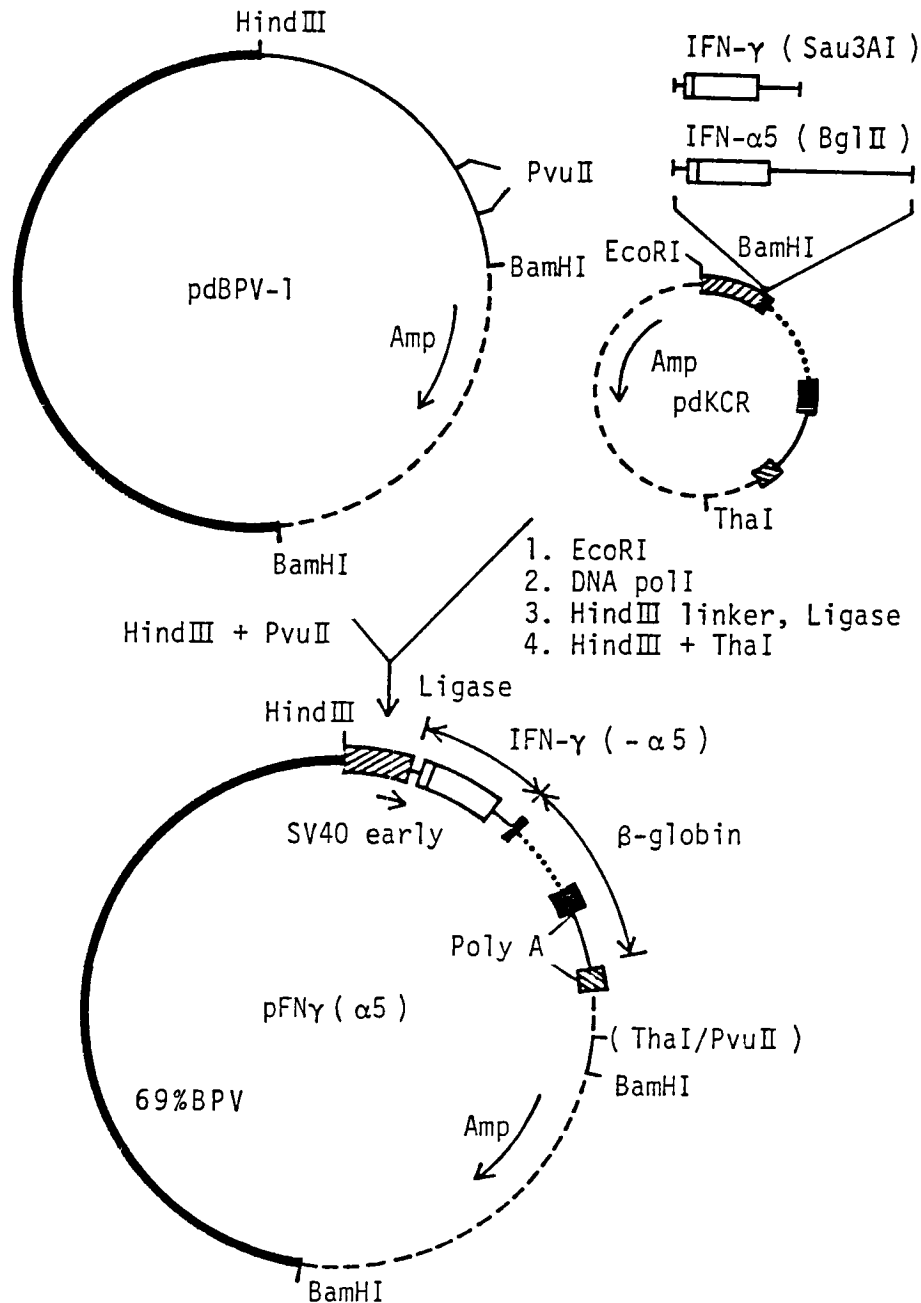


図3. ヒト IFN を動物細胞で発現させるための組み換えプラスミドの構築
斜線の入った枠はSV40 DNA を, 2 個の白ヌキ枠は IFN- γ cDNA あるいは IFN- α 5 DNA のシグナルペプチドおよび成熟タンパク質のコード領域を表す。2つの黒枠とその間の点線は、ウサギ β -グロビン遺伝子の第2エクソンの一部, 第3エクソン, 第2イントロンを表す。大腸菌のプラスミド (pML1, pML2) に由来する配列は破線で, BPV-1 ゲノムに由来する配列は実線で示した。太い実線は、BPV の69%領域を示す。Amp, β -ラクタマーゼ遺伝子

リメラーゼ I Klenow 断片を用いて両末端を平滑化した後、T 4 DNA リガーゼで *Hind*III リンカー（宝酒造，d(CAAGCTTG)）を接続した。これらのDNA を *Hind*III と *Tha*I で消化したのち、低融点アガロースゲル電気泳動で断片を分離し、最も長いDNA 断片（pdKCR- γ では2.9 kb、pdKCR- α 5 では3.9 kb）を精製した。これらのDNA 断片をそれぞれプラスミド pdBPV-1 の8.4 kb *Hind*III-*Pvu*II 断片に接続し、大腸菌 HB101 株にクローン化してプラスミド pFN γ ，pFN α 5 を得た。

III、プラスミド pBRIF γ の構築 pIF γ （図 7 B）を *Sau*3AI で切断しヒト IFN- γ cDNA の翻訳領域を含む0.84 kb のDNA 断片をアガロースゲル電気泳動によって精製した。このDNA 断片と、プラスミド pBR327 を *Bam*HI で消化したのちウシ小腸アルカリ性ホスファターゼで末端のリン酸基を除去したDNA 断片とを T 4 DNA リガーゼで接続し、大腸菌 HB101 株にクローン化してプラスミド pBRIF- γ を得た。ヒト IFN- γ cDNA を Northern ハイブリダイゼーションや Southern ハイブリダイゼーションのプロープにする場合には、pBRIF γ を 32 P で標識したものをを用いた。

17、組み換え遺伝子の培養細胞への導入（トランスフェクション）

培養細胞へのDNA の導入は、リン酸カルシウム共沈法（calcium phosphate co-precipitation method）（173,174,93）で以下のように行った。トランスフェクションを行うC127 細胞は、6 cm のプラスチックペトリ皿に 7×10^5 個ずつ撒いておき、翌日、新しい培地（4 ml）に交換してから4時間培養したものを使用した。10 μ g のプラスミドDNA を0.175 ml の1 mM Tris-HCl（pH 7.5），0.1 mM EDTA に溶解した後、25 μ l の2 M CaCl_2 を加えて混合した。0.2 ml の2 x HBS〔Hepes buffered saline; 50 mM Hepes-NaOH（pH 7.1），0.28 M NaCl, 1.5 mM Na_2HPO_4 〕を攪拌しながら上記DNA 液（0.2 ml）を滴々と加えた後、0 °Cで10 分間放置して沈澱を形成させた。このリン酸カルシウム-DNA 共沈体懸濁液（0.4 ml）を先の培養の培地（4 ml）に直接加え、37 °Cで培養した。4時間後、培地を捨て、細胞をTBS〔Tris buffered saline; 25 mM Tris-HCl（pH 7.4），140 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.5 mM Na_2HPO_4 〕で1回洗浄してから20 %グリセロールを含

むTBS を 5 ml 加えて室温で 3 分間放置し、再びTBS で洗浄した後、新しい培地を加えて培養を続けた。12 時間後、新しい培地に交換してさらに培養を続けた。

18、マウス細胞由来ヒト IFN- γ の精製

F γ 56 細胞を用いたヒト IFN- γ の生産およびその精製は、以下の 2 通りの方法で行った。

I、Con A-Sepharose カラムを用いる方法

F γ 56 細胞を 5 % FCS を含

むDMEM (14 cm プラスチックペトリ皿, 50 ml) で継代し、3 ~ 4 日後ほぼコンフルエントに達したところで培養上清を除いた。この培養上清は、下記の精製法 II に供した。ペトリ皿に付着している F γ 56 細胞を PBS(-) で 2 回洗浄してから血清を含まない DMEM (50 ml) を加えて、さらに培養を続けた。4 日後、培養液を集め、10,000 x g, 10 分間の遠心操作を行って得た上清を出発材料として精製を行った。以下の操作は特に断わらないかぎり 4 °C で行った。1700 ml の培養上清を、あらかじめ 150 mM NaCl を含む 20 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4) (緩衝液 A) で平衡化した CPG-10 のカラム (350 オングストローム, 120/200 メッシュ; カラム容量 10 ml; 18 x 52 mm) に流速 50 ml/hr でかけた。カラムを 50 ml の緩衝液 A および 100 ml の 0.5 M NaCl を含む緩衝液 A で洗浄 (流速 20 ml/hr) した後、0.4 M の塩化テトラメチルアンモニウム ($(\text{CH}_3)_4\text{NCl}$) を含む緩衝液 A で溶出 (流速 20 ml/hr) し、1.3 ml ずつ分取した。IFN 活性画分 (フラクション 7~26) を集め、2,000 ml の 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 20 mM NaCl (緩衝液 B) に対して 6 時間の透析を行った。さらに、2,000 ml ずつの新しい透析液で 2 回、それぞれ 12 時間透析した後、生じた不溶物を 10,000 x g, 10 分間の遠心操作により除いた。この上清 (26 ml) をあらかじめ緩衝液 B で平衡化した DEAE-トヨパール 650 のカラム (カラム容量 10 ml; 10 x 130 mm) にかけた後、カラムを同緩衝液で洗浄し、通り抜け画分 (21 ml) と最初のカラム洗液 (13 ml) を合わせて DEAE-非吸着画分とした。この DEAE-非吸着画分 (34 ml) に 3.8 ml の 0.2 M リン酸ナトリウム緩衝液, 1.5 M NaCl を加え、これをあらかじめ緩衝液 A で平衡化した Con A-Sepharose 4B のカラム (カラム容量 2 ml; 10 x 31 mm) に流速 10 ml/hr でかけ

た。カラムを50 ml の緩衝液Aで洗浄（流速5 ml/hr）した後、100 mM α -メチル D-マンノシドを含む緩衝液Aで溶出（流速2 ml/hr）し、0.5 ml ずつ分取した。IFN 活性画分（フラクション8～10）を集め、精製標品とした。精製標品は分注して-20 °Cまたは4 °Cで保存した。

II、抗ヒトIFN- γ モノクローナル抗体カラムを用いる方法 本法では、当研究室の宮田らが開発した抗ヒトIFN- γ モノクローナル抗体カラムを用いて宮田らの方法(73)に従って次のように精製を行った。精製の出発材料としては、F γ 56細胞を5 % FCS を含むDMEM で培養した培養上清（方法Iで記載したもの）を用いた。まず、1,700 ml の培養上清に10,000 \times g, 10 分間の遠心操作を行って細胞片などの不用物を除き、0.18 ml の0.1 M フェニルメチルスルホニルフルオリドを加えて終濃度10 μ M とした。これを、あらかじめ0.5 M NaClを含む20mM リン酸ナトリウム緩衝液（pH 7.2）（緩衝液C）で平衡化した抗体カラム（カラム容量9 ml; 10 \times 115 mm）に流速30 ml/hr でかけ、200 ml の緩衝液Cで洗浄した後、50 mM Na₂CO₃（pH 11.0）, 0.5 M NaClで溶出（流速0.33 ml/min）した。溶出液は1.0 ml ずつ分取し、100 mM KH₂PO₄を用いて速やかに中和（pH 7～8）した。IFN 活性画分（フラクション4～9；計8 ml）を集めて透析チューブに入れ、これにAquacide II をまぶして脱水濃縮を行った。約3 ml にまで濃縮した後Aquacide IIを除き、500 ml のPBS(-)に対して8時間透析した。これを精製標品として-20 °Cまたは4 °Cで保存した。

19、NH₂-末端アミノ酸配列の決定

NH₂-末端アミノ酸配列の決定は、サントリー生物医学研究所の久保田一郎博士に協力していただいた。

トリプシン消化ペプチドの分画，精製は次のように行った。まず、0.1 mg の精製IFN- γ 試料を溶かした0.5 % NH₄HCO₃ 緩衝液（pH 8.5, 0.2 ml）に5 μ g のTPCK処理トリプシン（Sigma）を加え、37 °Cで16時間の消化反応を行った。これを0.1 %トリフルオロ酢酸と6.5 %アセトニトリルを含む緩衝液（pH 2.0）で平衡化した逆相高速液体クロマトグラフィー（HPLC）のカラム（Cosmosil 5C18-P, 4.6 mm \times

250 mm) にかき、0.1 %トリフルオロ酢酸を含む6.5~38.5 %アセトニトリル直線濃度勾配 (流速1.0 ml/min, 全60 分) によって溶出を行った。214 nm および280 nm の吸光度によって各ペプチドを検出し、必要に応じてピーク画分を回収した。

ペプチド断片のピログルタミン酸アミノペプチダーゼ反応は、次のように行った。まず、HPLC カラムから溶出したピーク画分 (約8 nmol) を真空下で乾燥させてトリフルオロ酢酸およびアセトニトリルを除いた。これを、0.04 ml の50 mM ピリジン-酢酸緩衝液 (pH 7.0) に溶解し、3 μ l の1 mg/ml ピログルタミン酸アミノペプチダーゼ (ベーリンガー, 総タンパク質濃度は20 mg/ml) を加え、37 $^{\circ}$ C で16 時間反応させた。

ペプチド断片のアミノ酸配列は、Applied Biosystems 社製の気相アミノ酸配列解析装置 (Model 470A) を用いた気相エドマン法 (175,176,177) によってNH₂-末端側より逐次的に遊離したフェニルチオヒダントインアミノ酸 (PTH-アミノ酸) を日立アミノ酸分析装置 (Model 835) を用いて同定することによって決定した。

20、組み換え IFN- α 5 の 35 S 標識と免疫沈降

24 ウェルのプレート (ϕ 15 mm) にFV10 細胞あるいはF α 28 細胞を培養し、コンフルエントに達したのち培養液を捨て、細胞をメチオニン不含MEM で3 回洗浄した。これに、メチオニン不含MEM 培地 (0.4 ml) と同培地に対して透析したFCS (0.04 ml) を添加し、さらに0.1 ml の1 mCi/ml [35 S]メチオニン (400 Ci/mmol) を加えて37 $^{\circ}$ C で20 時間培養した。標識された組み換え IFN- α 5 の免疫沈降反応は、ウサギ抗ヒト IFN- α 抗血清とプロテイン A吸着体 (*Staphylococcus aureus* Cowan I 株をホルマリン固定したもの) を用いる方法 (138) に従って行った。

21、Northern およびSouthern トランスファー

RNA のアガロースゲル電気泳動は、ホルムアミド-ホルムアルデヒド変性条件下 (169,178) に行った。0.3~30 μ g のRNA 試料を50 %ホルムアミドおよび6.7 %ホルムアルデヒドを含むMAE 緩衝液 [20 mM 3-(N-morpholino)propanesulfonic acid-KOH (pH 7.0), 15 mM 酢酸ナトリウム, 1 mM EDTAを含む] 30 μ l に溶解

し、55 °Cで15 分間加温して変性させたのち、6.4 %ホルムアミドを含むMAE 緩衝液で作製した1.3 %アガロースゲルの電気泳動を行った。電解液にはMAE 緩衝液を用いた。泳動後のゲルを水中に15 分間浸してから、20 x SSC〔20 x SSC は、0.3 Mクエン酸ナトリウム (pH 7.0) , 3 M NaClである〕を用いてニトロセルロースフィルターへのNorthern トランスファー(179)を行った後、真空下で80 °C, 2 時間の熱処理によってRNA を固定化し、ハイブリダイゼーションに供した。

Southern トランスファー(180)の場合には、種々の制限酵素で切断したDNA のアガロースゲル電気泳動(0.8 %アガロースゲル)をTAE 緩衝液を用いて行った後、Wahl らの方法(181)に従ってニトロセルロースフィルターへのトランスファーおよびDNA の固定化を行った。

22. Southern およびNorthern ハイブリダイゼーション

Southern およびNorthern ハイブリダイゼーションは、Wahl らの方法(181)を一部改変して、通常、次のように行った。核酸を固定したフィルターをプレハイブリダイゼーション溶液〔5 x SSC, 5 x Denhardt's, 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.5) , 50 %ホルムアミド, 0.25 mg/ml 変性サケ精子DNA, 0.1 % SDS〕に浸し、10~15 時間、42 °Cに保温した後、ハイブリダイゼーション溶液〔5 x SSC, 1 x Denhardt's, 20 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.5) , 50 %ホルムアミド, 0.1 mg/ml 変性サケ精子DNA, 0.1 % SDS, 8 %硫酸デキストラン, 2~8 x 10⁶ dpm/ml ³²P-標識プローブDNA (比活性1~2 x 10⁸ dpm/μg DNA)〕に浸し、15~20 時間、42 °Cに保温した。ハイブリダイゼーション後のフィルターは、200 ml ずつの 2 x SSC, 0.1 % SDSを用いて室温で20 分間の洗浄を3 回行い、さらに200 ml ずつの0.2 x SSC, 0.1 % SDSを用いて50 °Cで40 分間の洗浄を3 回行った後室温で風乾し、X線フィルムと増感スクリーンを重ねて-80 °Cで1~2 日露光した。

結 果

第1部、ヒト IFN- γ の cDNA および染色体遺伝子の単離と構造解析

1、ヒト脾リンパ球による IFN- γ の産生

ヒト IFN- γ の代表的な産生系は、末梢血リンパ球初代培養細胞を T 細胞マイトゲン (Con A, PHA, SEA など) で刺激するか、あるいはこれらのマイトゲンとフォルボールエステル (TPA など) を併用して刺激する方法がよく知られている (182,183)。筆者らは、大量のリンパ球を調製できるヒト脾臓から脾リンパ球を調製し、IFN- γ の産生条件を検討した。SEA, PHA で単独に、あるいはこれらと TPA の併用によって刺激した脾リンパ球による IFN 産生の経時変化を図 4 に示した。

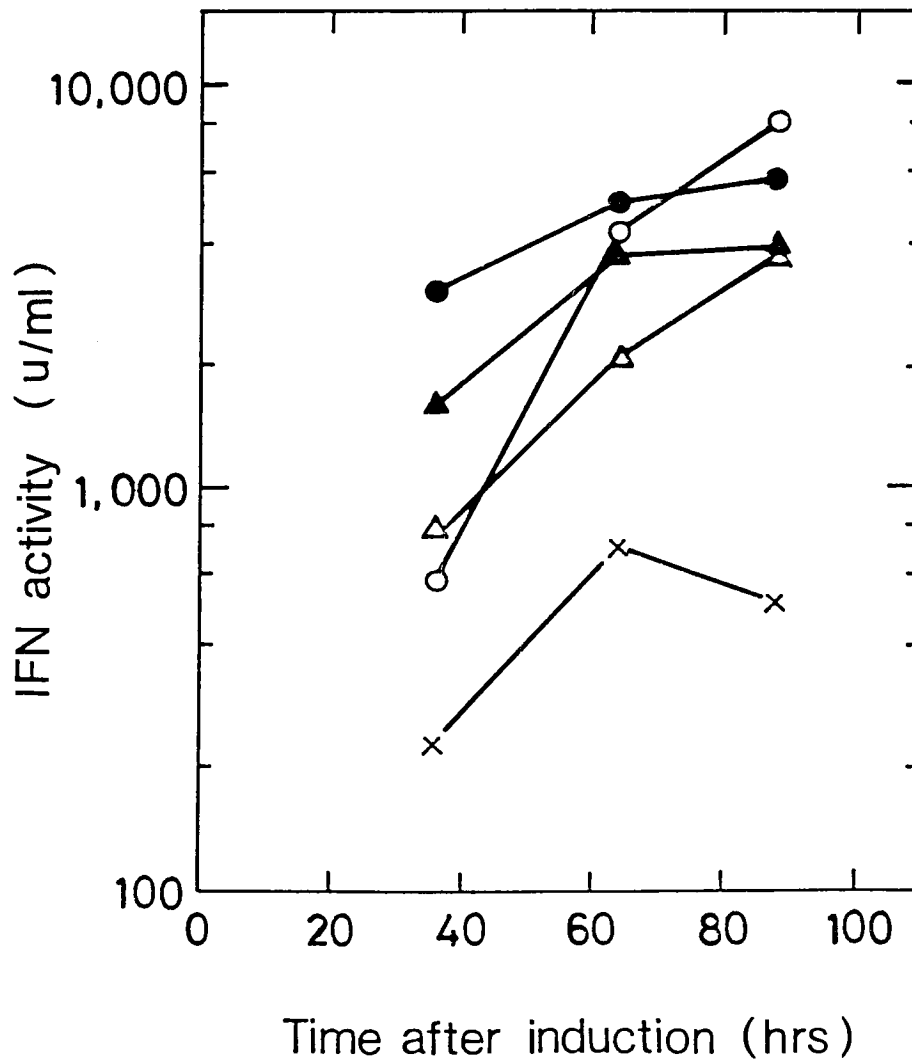


図 4. 脾リンパ球による IFN 産生の経時変化

5 % CS を含む 30 ml の RPMI-1640 培地に脾リンパ球を 4×10^6 cells/ml の濃度で浮遊させ、終濃度 $0.1 \mu\text{g/ml}$ の SEA または $5 \mu\text{g/ml}$ の PHA を加えて 37°C で静置

培養した。TPA を加える場合には、まず TPA を終濃度 5 ng/ml になるように加えて 37 °C で 2 時間培養してから、SEA あるいは PHA を加えて 37 °C で培養した。SEA, PHA を添加後、各時間に 1 ml の培養液を採取して 2,000 × g で 10 分間の遠心操作を行い、上清中の IFN 活性を測定した。(—○—) SEA; (—△—) PHA; (—●—) TPA + SEA; (—▲—) TPA + PHA; (—X—) 無添加

SEA や PHA 単独で刺激した場合には、刺激後 90 時間以上にわたって IFN 産生が継続した。マイトゲンを加える前にあらかじめ TPA で刺激した場合には培養初期の産生量は増加したが、およそ 60 時間でほぼ一定に達し、最終的な IFN 収量はむしろマイトゲン単独より低いことが示された。同様の結果が Davos らによって報告されており(184)、脾リンパ球の系では TPA による IFN- γ の産生量増加効果はないと考えられる。また、これらの IFN 誘起剤を加えない場合にも、60 時間前後をピークとする数百単位/ml の IFN が産生された。このような自然誘発 IFN の例は末梢リンパ球の産生系では報告されていないが、筆者らの脾リンパ球を用いた系では常に比較的高単位の自然誘発 IFN が認められた。

次に、脾リンパ球で産生された抗ウイルス活性が IFN- γ のそれであることを確認するために、抗 IFN 抗体を用いた中和試験を行った(表 1)。SEA 刺激脾リンパ球

表 1. 抗ヒト IFN 抗体による脾リンパ球 IFN の中和試験

	IFN titer (u/ml)		
	no treatment	anti-IFN-(α/β)	anti-IFN- γ
Splenocyte IFN Exp.1	16,000	16,000	2,000
2	8,000	6,800	700
Control IFN- α	8,600	200	n.t.
Control IFN- γ	600	600	n.t.

5 単位/ml の抗ヒト IFN-(α/β)抗体, あるいは 1 単位/ml の抗ヒト IFN- γ 抗体の存在下に各 IFN 試料の抗ウイルス活性を測定した。抗体の力価表示は、10 u/ml の参照 IFN 試料を 1 u/ml に低下させる抗体濃度をもって 1 単位/ml とする表現法(213)に基づいた。 n.t.未測定

由来の抗ウイルス活性は、ヒト IFN- α , IFN- β の双方に対して中和活性を有する抗血清 5 単位を用いてもほとんど中和されなかったが、ヒト IFN- γ に対する抗血清 1 単位によって残存活性約 10 % に中和された。この結果は、SEA 刺激脾リンパ球培養上清中の抗ウイルス活性のほとんど全てが IFN- γ によるものであることを示している。

以上の結果から、脾リンパ球培養での IFN- γ 誘起剤としては SEA を用いることにした。表 2 に示すように、SEA 濃度 0.01~0.1 $\mu\text{g/ml}$ の範囲において IFN 産生量はほぼ一定であった。そこで、以後の IFN- γ mRNA 調製のための大量培養においては、0.02 $\mu\text{g/ml}$ の SEA で脾リンパ球を刺激して、IFN 産生速度が最大になる 60 時間後に細胞を回収することにした。

表 2 . IFN 産生の SEA 濃度依存性

		Interferon titer (u/ml)			
		concentration of SEA ($\mu\text{g/ml}$)			
		0	0.01	0.05	0.10
Exp.1	4,600	26,000	26,000	19,000	
2	4,900	8,200	8,200	8,200	
3	2,000	5,400	8,000	n.t.	

図 4 で述べた方法で脾リンパ球を培養し、種々の SEA 濃度での IFN 産生量を測定した。 n.t. 未測定

2、IFN- γ mRNA の抽出と部分精製

細胞から mRNA を抽出する際には、内在するリボヌクレアーゼによる RNA の分解を極力さける必要がある。筆者らは、強力なタンパク質変性剤であるチオシアン酸グアニジンの存在下に細胞を破碎して RNA を抽出する Chirgwin らの方法 (152) を用いた。まず、この方法によって $1 \sim 4 \times 10^{10}$ 個の SEA 刺激脾リンパ球から 4 ~ 14

mg の RNA を抽出し、これをオリゴ-(dT) セルロースのカラムクロマトグラフィーにかけることによって 0.4~1.0 mg のポリ(A)+RNA を得た。2 μ g のポリ(A)+RNA をアフリカツメガエル卵母細胞に微量注入し、その培養上清中の抗ウイルス活性を測定したが、有意な活性は検出できなかった (< 10 u/ml)。これは全 mRNA に対する IFN- γ mRNA の含有量が低いのではないかと考え、mRNA を分子量によって分画するためにシヨ糖密度勾配超遠心を行った (図 5)。各画分から RNA を回収し、こ

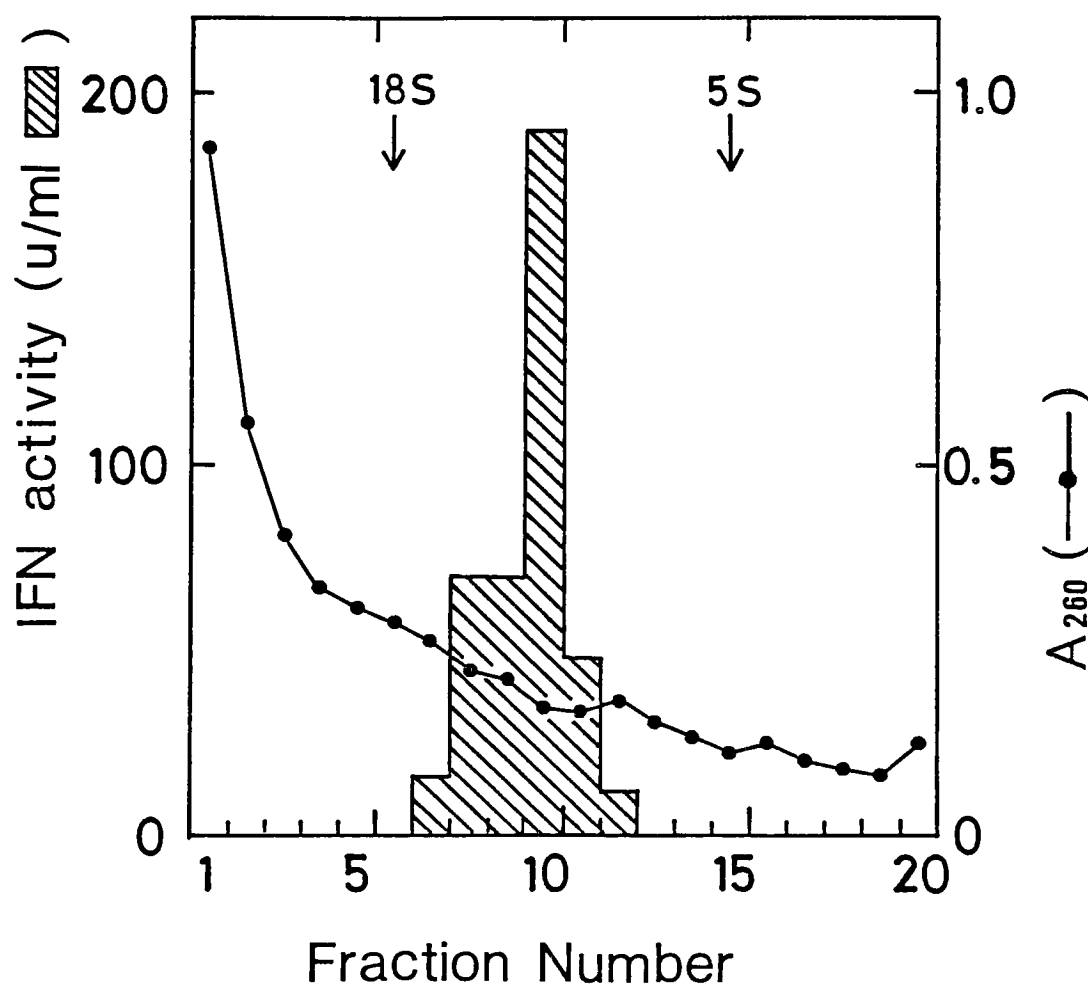


図 5. シヨ糖密度勾配超遠心によるヒト IFN- γ mRNA の精製

SEA で刺激後 60 時間の培養を行った脾リンパ球からポリ(A)+RNA を抽出し、その 200 μ g をシヨ糖密度勾配超遠心によって分画した。各画分のポリ(A)+RNA をエタノール沈殿操作によって回収して 40 μ l の水に溶解した。それぞれ 2 μ l を分取してアフリカツメガエル卵母細胞の翻訳系 (「材料と方法」- 9) を用いて IFN mRNA の活性を測定した。沈降係数 5 S および 18 S の位置は、ヒトのリボソーム RNA を平行して遠心することによって決定した。

れを卵母細胞に微量注入して培養上清中の IFN 活性を測定したところ、画分 7～12 の RNA を注入した卵母細胞の培養上清中に有意な抗ウイルス活性が検出された。表 3 に示すように、この抗ウイルス活性は抗ヒト IFN- α / β 抗体ではほとんど中和されず、抗ヒト IFN- γ 抗体によって中和された。これらの結果は、このポリ (A) +RNA 画分にヒト IFN- γ をコードする mRNA が含まれていることを示している。ヒト IFN- γ mRNA 活性は画分 10, すなわちおよそ 13 S の位置に単一のピークを示した (図 5)。ショ糖密度勾配超遠心によって、200 μ g のポリ (A) +RNA から 10 μ g の部分精製 IFN- γ mRNA (図 5 の画分 8～11) が得られた。数回の実験で集めた部分精製 IFN- γ mRNA を合わせ、cDNA 合成の鋳型として用いた。

表 3. 卵母細胞によって合成された IFN の抗原性の解析

Fraction No.	IFN titer (u/ml)		
	no treatment	anti-IFN-(α / β)	anti-IFN- γ
8	70	n.t.	< 14
9	70	n.t.	< 14
10	190	140	< 20
11	48	n.t.	< 14

図 5 の画分 8～11 のポリ (A) +RNA を注入した卵母細胞の培養上清を用いて、表 1 と同様の方法で中和試験を行った。 n.t. . . . 未測定

3. IFN- γ cDNA の単離と構造解析

まず、部分精製したヒト IFN- γ mRNA (20 μ g) を鋳型にして「材料と方法」-10 の方法 I で述べた方法に従って cDNA を合成し、dG:dC ホモポリマー法によってプラスミド pBR322 の *Pst*I 部位に挿入した。この組み換えプラスミドを用いて大腸菌 *x* 1776 株を形質転換し、約 4,000 個のクローン (テトラサイクリン耐性) からなる cDNA ライブラリーを得た。このなかから IFN- γ cDNA を有するクローンを単離するためには、それを特異的に検出する方法でスクリーニングする必要がある。筆

者らは、Gray らによって既に発表されたcDNA 塩基配列 (74)の一部に相当する配列を持つ14塩基のオリゴヌクレオチド (図2) をプローブに用いたコロニーハイブリダイゼーション (「材料と方法」-12 の方法I) によって、スクリーニングを行った。ハイブリダイゼーションは、基本的にはWallace ら (164)の方法に従い、ハイブリダイゼーションおよび洗浄の温度を31 °C、34 °C、37 °Cの3通りで行った。31 °Cではほぼ全てのコロニーのDNA がプローブとハイブリダイズしたが、34 °Cおよび37 °Cでは強くハイブリダイズするのは数個のクローンのみであり、プローブに相補的な配列を特異的に検出していることが期待された。再現性のあるシグナルを与える7個のクローンからプラスミドDNA を調製し、それぞれ *Pst*Iで切断して挿入部分 (cDNA) の鎖長を調べるとともに、*Hinf*I、*Taq*I、*Alu*I、*Mbo*IIなどの制限酵素切断点地図 (以下、制限酵素地図) を作製した (図6)。7個のプラスミドのうちの4個はcDNA の長さも制限酵素地図も全く同じであることから、もともと単一のクローン由来のプラスミドであると考えられた。すなわち、異なるクローンは4

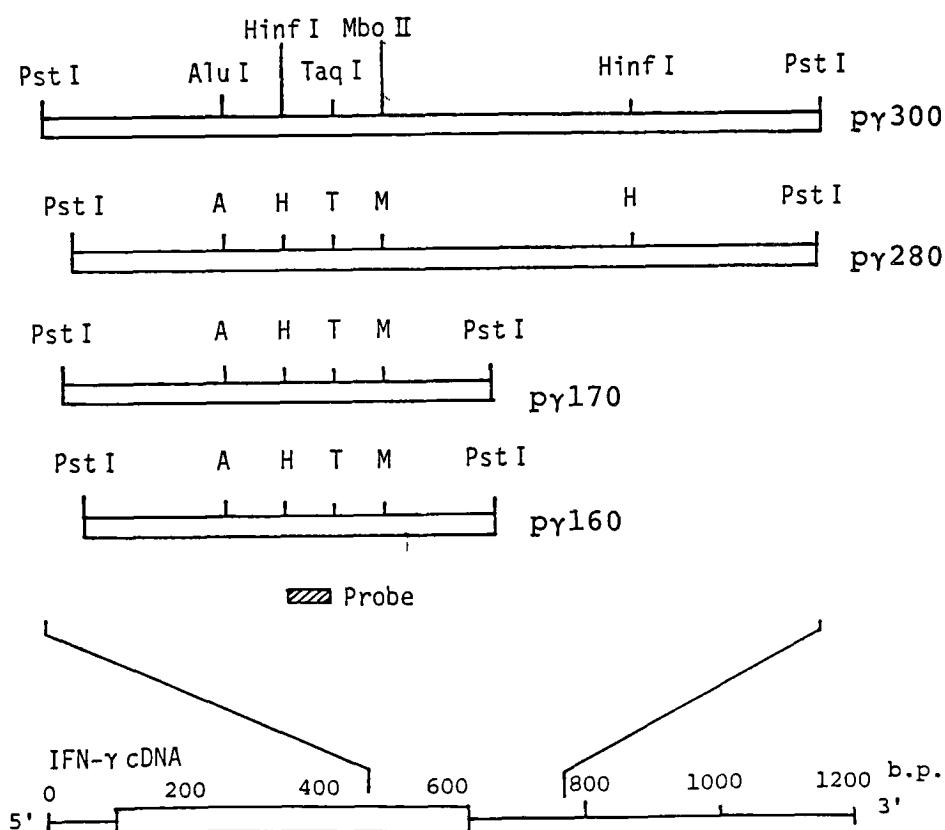


図6. クローン化したIFN- γ cDNA の制限酵素地図 (1)

コロニーハイブリダイゼーションによって選択した4個の形質転換株 (p γ 300, p γ 280, p γ 170, p γ 160) からプラスミドを調製し、挿入部分の制限酵素地図を作製した。下段にGray らの発表したIFN- γ cDNA(74) の対応する部分を示した。斜線で示した枠は、合成オリゴヌクレオチドプローブの位置を表す。

A = *AluI*, H = *HinfI*, T = *TaqI*, M = *MboII*

個であった。この4個のプラスミド (それぞれプラスミドp γ 300, p γ 280, p γ 170, p γ 160 とした。) の挿入部分は、その鎖長が互いに異なっており、明らかに独立のクローン由来のものであったが、その制限酵素地図は共通のパターンを示し、しかもそれは、既に発表されたIFN- γ cDNA の制限酵素地図の一部 (74,76) と一致していた。これらの結果は、この4個のクローンがヒトIFN- γ cDNA の一部を含むものであることを示している。しかし、このうち最も鎖長の長いcDNA (プラスミドp γ 300) でもその長さは約290塩基対しかなく、mRNA の全長におよぶものではなかった。

そこで、より鎖長の長いcDNA クローンを得るために、新たに3 μ g の部分精製IFN- γ mRNA を鋳型としてOkayama とBerg の方法(141)に従ってcDNA 組み換えプラスミドを調製した。これを用いて大腸菌SK1592 株を形質転換して約50,000 個のクローン (アンピシリン耐性) からなるcDNA ライブラリーを作製し、再びコロニーハイブリダイゼーション(163)によるスクリーニングを行った。プローブとしては、先に得たプラスミドp γ 300 を *PstI* で切断したのちアガロースゲル電気泳動によって精製したcDNA 断片 (約290塩基対) をニックトランスレーション法で標識したものを扱い、「材料と方法」-12 の方法II でハイブリダイゼーションを行った。再現性のあるシグナルを与える21 個のクローンを単離してプラスミドDNA を調製し、それぞれを *PstI* と *PvuII* とで二重切断してcDNA の鎖長を調べるとともに、*DdeI*, *Sau3AI*, *HinfI*, *TaqI* などの制限酵素地図を作製し、Gray ら (74), Devos ら (76) のIFN- γ cDNA の制限酵素地図と比較した。IFN- γ mRNA の全長に相当するcDNA は見出されなかったが、mRNA のいろいろな部分に対応すると考えられるcDNA クローンが得られた。そのうちの2つ (図7 A; プラスミドp γ 1002,

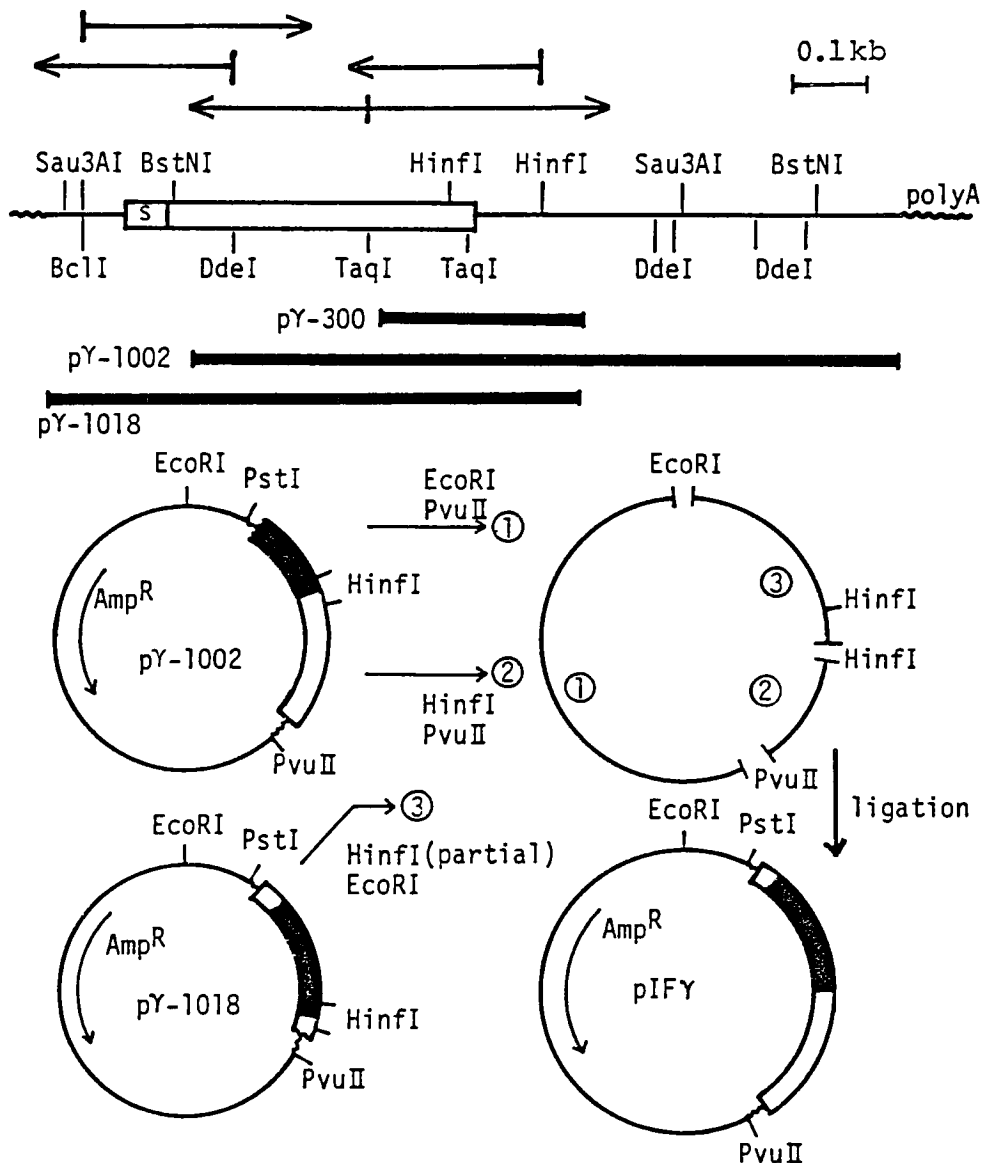


図7. クローン化したIFN- γ cDNA の制限酵素地図 (2)

A、Okayama と Berg の方法で作製したcDNA ライブラリーから単離したヒトIFN- γ の部分cDNA の制限酵素地図。下の太線は、オーバーラップを有する2つのプラスミド (pY-1002, pY-1018) とプローブに用いたpY-300 がカバーしている部分を示す。白ヌキ枠は、IFN- γ 前駆体をコードする領域を表す。「S」の部分は、シグナルペプチドである。地図上の矢印は塩基配列を決定した開始点と方向およびその範囲をあらわす。

B、IFN- γ mRNA の全長に対応するcDNA (pIF γ) の作製。まず、プラスミドpY-1002 を *EcoRI*, *PvuII*, *HinfI* などて消化し、2.3 kb *EcoRI*-*PvuII* 断片 (①) と 0.6 kb *HinfI*-*PvuII* 断片 (②) を調製した。また、プラスミドpY-1018 を *HinfI* で部分消化した後、*EcoRI* で切断し、1.0 kb *EcoRI*-*HinfI* 断片 (③) を精製した。3つのDNA断片をT4 DNA リガーゼで接続し、大腸菌HB101株にクローン化してプラスミドpIF γ を得た。

pγ 1018) は、約 560 塩基対の DNA 領域を共有しつつ、それぞれ 3'側, 5'側の非コード領域に相当する部分までをも含んでおり、両者の塩基配列を合わせることによって全長の cDNA に相当しうることが示された。そこで、図 7 B に示すように、この 2 つの cDNA を両者の 3'非コード領域の *Hinf*I 部位で接続することによって全長の cDNA を含むプラスミドを構築し、これをプラスミド pIFγ と名付けた。

筆者らの得た cDNA が実際に IFN-γ のアミノ酸配列をコードしているかどうかを確認するために、cDNA のコード領域とその周辺領域に相当する部分の塩基配列を図 7 A に示した手順で決定した。決定したコード領域 (coding region) とその上流および下流の非コード領域 (non-coding region) の塩基配列、およびその推定アミノ酸配列を図 8 に示した。この塩基配列は、Devos らの発表したヒト IFN-γ cDNA の塩基配列 (76) と完全に一致しており、Gray らの塩基配列 (74) とはただ一箇所 (539 番の G) が異なるのみであった。いずれの場合も、最初に現れる開始コドン (ATG) から始まる 498 ヌクレオチドのオープンリーディングフレームを持ち、166 アミノ酸残基からなるポリペプチド鎖をコードし得る。筆者らと Devos らの cDNA の推定アミノ酸配列は当然同じであるが、Gray らの配列では 137 番目の Arg が Gln に置き代わっている。ヒト IFN-γ の NH₂-末端アミノ酸配列は、< Glu-Asp-Pro-Tyr-Val- …… である (72) ことから、はじめのメチオニンから 23 番目のシステインまでが分泌の際に切断されるシグナルペプチドであり、成熟 IFN-γ タンパク質のポリペプチド鎖は 143 アミノ酸残基から成ると考えられる。

プラスミド pIFγ の挿入 cDNA が実際にヒト IFN-γ の活性を有するタンパク質をコードしていることは、この cDNA をサル COS-7 細胞やマウス C127 細胞で発現させてその生成物の性状を調べることによって確認した (後述)。

4. IFN-γ 染色体 DNA の単離

ヒト IFN-γ 染色体遺伝子は、既に Gray ら (78), Taya ら (79) によってクローン化され、その全塩基配列およびエキソン・イントロン構成が明らかにされている。筆者らも、ヒト IFN-γ cDNA をプローブとして、T. Maniatis 博士より供与されたヒト染色体 DNA ライブラリーをスクリーニングしてその染色体遺伝子を単離した。

GAT.CAG.CTT.GAT.ACA.AGA.ACT.ACT.GAT.TTC.AAC.TTC.TTT.GGC.TTA.ATT.CTC.

TCG.GAA.ACG.ATG.AAA.TAT.ACA.AGT.TAT.ATC.TTG.GCT.TTT.CAG.CTC.TGC.ATC.
MET-Lys-Tyr-Thr-Ser-Tyr-Ile-Leu-Ala-Phe-Gln-Leu-Cys-Ile-
S1 S10

GTT.TTG.GGT.TCT.CTT.GGC.TGT.TAC.TGC.CAG.GAC.CCA.TAT.GTA.AAA.GAA.GCA.
Val-Leu-Gly-Ser-Leu-Gly-Cys-Tyr-Cys-Gln-Asp-Pro-Tyr-Val-Lys-Glu-Ala-
S20 1

GAA.AAC.CTT.AAG.AAA.TAT.TTT.AAT.GCA.GGT.CAT.TCA.GAT.GTA.GCG.GAT.AAT.
Glu-Asn-Leu-Lys-Lys-Tyr-Phe-Asn-Ala-Gly-His-Ser-Asp-Val-Ala-Asp-Asn-
10 20

GGA.ACT.CTT.TTC.TTA.GGC.ATT.TTG.AAG.AAT.TGG.AAA.GAG.GAG.AGT.GAC.AGA.
Gly-Thr-Leu-Phe-Leu-Gly-Ile-Leu-Lys-Asn-Trp-Lys-Glu-Glu-Ser-Asp-Arg-
30 40

AAA.ATA.ATG.CAG.AGC.CAA.ATT.GTC.TCC.TTT.TAC.TTC.AAA.CTT.TTT.AAA.AAC.
Lys-Ile-Met-Gln-Ser-Gln-Ile-Val-Ser-Phe-Tyr-Phe-Lys-Leu-Phe-Lys-Asn-
50

TTT.AAA.GAT.GAC.CAG.AGC.ATC.CAA.AAG.AGT.GTG.GAG.ACC.ATC.AAG.GAA.GAC.
Phe-Lys-Asp-Asp-Gln-Ser-Ile-Gln-Lys-Ser-Val-Glu-Thr-Ile-Lys-Glu-Asp-
60 70

ATG.AAT.GTC.AAG.TTT.TTC.AAT.AGC.AAC.AAA.AAG.AAA.CGA.GAT.GAC.TTC.GAA.
Met-Asn-Val-Lys-Phe-Phe-Asn-Ser-Asn-Lys-Lys-Lys-Arg-Asp-Asp-Phe-Glu-
80 90

AAG.CTG.ACT.AAT.TAT.TCG.GTA.ACT.GAC.TTG.AAT.GTC.CAA.CGC.AAA.GCA.ATA.
Lys-Leu-Thr-Asn-Tyr-Ser-Val-Thr-Asp-Leu-Asn-Val-Gln-Arg-Lys-Ala-Ile-
100 110

CAT.GAA.CTC.ATC.CAA.GTG.ATG.GCT.GAA.CTG.TCG.CCA.GCA.GCT.AAA.ACA.GGG.
His-Glu-Leu-Ile-Gln-Val-Met-Ala-Glu-Leu-Ser-Pro-Ala-Ala-Lys-Thr-Gly-
120

AAG.CGA.AAA.AGG.AGT.CAG.ATG.CTG.TTT.CGA.GGT.CGA.AGA.GCA.TCC.CAG.TAA.
Lys-Arg-Lys-Arg-Ser-Gln-Met-Leu-Phe-Arg-Gly-Arg-Ala-Ser-Gln Stop
130 140

TGG.TTG.TCC.TGC.CTG.CAA.TAT.TTG.AAT.TTT.AAA.TCT.AAA.TCT.ATT.TAT.TAA.

TAT.TTA.ACA.TTA.TTT.ATA.TGG.GGA.ATA.TAT.TTT.TAG.ACT

まず、バクテリオファージ λ Charon 4A-ヒト染色体遺伝子ライブラリー (137) を大腸菌 K803 株 (169) に接種し、寒天培地上に約 6×10^5 個のプラーク (14 cm プレート, 16 枚) を形成させた。次に、pIF γ を *Sau3AI* で切断して IFN- γ cDNA を含む 0.84-kb の DNA 断片を精製し、これを ^{32}P で標識したものをプローブとして Benton と Davis の方法 (185) に従ってプラークハイブリダイゼーションを行い、プローブとハイブリダイズする 5 個のクローンを得た。それぞれの組み換えファージクローンから DNA を調製し (169)、*EcoRI*, *BamHI*, *HindIII*, *PvuII*, *HincII*, *HpaII* の制限酵素地図を作製したところ、いずれも同じパターンを示し、全て単一のクローンに由来することが示唆された。筆者らの得たクローンの制限酵素地図は、Gray らの発表した地図 (78) と同一であり、エキソン・イントロン構成や塩基配列のレベルでも大きな違いはないものと思われる。IFN- γ 染色体遺伝子の構造は図 14 A (後述) に示した。

第2部、マウス培養細胞によるヒト IFN- γ および IFN- α 5 の生産

5. ヒト IFN- γ cDNA のサル COS-7 細胞における発現

筆者らの得た cDNA (pIF γ) が実際に IFN- γ の活性を有するタンパク質をコードしていることを確認するために、この cDNA をサル COS-7 細胞で発現させることを試みた。COS-7 細胞はサル CV-1 細胞を SV40 でトランスホームして得られた細胞株で(148)、SV40 T 抗原を構成的に発現している。そのため、SV40 の複製開始部位を含むプラスミドを COS-7 細胞に導入すると細胞内で一過的に複製され、そのコピー数は数千コピー以上に達することが知られている。発現のための組み換えプラスミドである pdKCR- γ は、cDNA の全コード領域を含む 0.84 kb *Sau3AI* 断片をプラスミド pdKCR(142) の *BamHI* 部位に挿入して構築した(図3)。このプラスミドでは、SV40 の複製開始部位と初期プロモーターの直後に IFN- γ cDNA のコード領域が接続されており、さらにその下流にウサギ β -グロビン遺伝子のイントロンとポリ(A)付加部位が位置する構成になっている。これを COS-7 細胞に導入すると、複製されたプラスミドの SV40 プロモーターから転写が始まり、ウサギ β -グロビンのポリ(A)付加部位までの mRNA 前駆体が合成されるはずである。さらにこの mRNA 前駆体に含まれるウサギ β -グロビン由来のイントロンがスプライシングによって除去され、成熟 mRNA が生成すると考えられる。この成熟 mRNA はシグナルペプチドを NH₂-末端に有するヒト IFN- γ 前駆体タンパク質をコードすることになる。従って、COS-7 細胞などの異種哺乳類細胞においてもヒトの細胞におけると同様のプロセッシング(シグナルペプチドの切断)を経た成熟 IFN- γ が細胞外に分泌されることが期待できる。

プラスミド pdKCR- γ あるいは元のベクターである pdKCR をリン酸カルシウム共沈法によって COS-7 細胞にトランスフェクションし、3 日後の培養上清中の IFN 活性を測定した。表 4 に示すように、pdKCR を導入した細胞の培養上清には抗ウイルス活性は検出されなかったが、プラスミド pdKCR- γ を導入した細胞の培養上清には顕著な抗ウイルス活性が認められた。この抗ウイルス活性は抗ヒト IFN- α / β 抗体では中和されず、抗ヒト IFN- γ 抗体によって特異的に中和された。IFN- γ cDNA の代わりにヒト IFN- α 5 遺伝子(50)のコード領域を組み込んだプラスミド(pdKCR- α 5)

表 4 . IFN- γ cDNA を導入したサル COS-7 細胞によるヒト IFN- γ の発現

Plasmid	no antiserum	anti-IFN(α/β)	anti-IFN- γ
pdKCR	< 10	n.t.	n.t.
pdKCR-IFN γ	1,250	1,150	16
pdKCR-IFN α 5	230	< 10	230

24 ウェルのマイルロプレート (ϕ 15 mm) に 7.5×10^4 個の COS-7 細胞を播き、10% FCS を含む DMEM で培養を行った。12 時間後、それぞれ $1 \mu\text{g}$ のプラスミド pdKCR, pdKCR- γ , pdKCR- α 5 を用いて「材料と方法」- 17 に述べた方法によってトランスフェクションを行い、さらに培養を続けた。72 時間後に培養上清を採取し、IFN 活性を測定した。中和試験は、表 1 と同様に行った。n.t. 未測定

を用いたポジティブコントロールの抗ウイルス活性は、抗ヒト IFN- α/β 抗体でのみ中和された (表 4) 。以上の結果は、筆者らの得た cDNA が確かにヒト IFN- γ の生理活性・抗原性を有するタンパク質をコードしていることを示している。

6 . BPV-IFN 組み換え体の構築

上述した実験では、クローン化した cDNA を COS-7 細胞で発現させることによってヒト IFN- γ を生産できることが示されたが、導入した DNA が複製した COS-7 細胞は安定に増殖できないため、この宿主-ベクター系では IFN を構成的に生産する形質転換株を得ることは困難と思われる。筆者らは、培養細胞を用いてヒト IFN- γ を構成的に大量生産するために、マウス C127 細胞とウシパピローマウイルス (BPV) DNA を宿主-ベクター系とする遺伝子発現系を試みた。BPV ベクターを用いた発現プラスミド (pFN γ) は、先のプラスミド pdKCR- γ の混成遺伝子部分 (SV40, IFN- γ cDNA, ウサギ β -グロビン由来の DNA からなる部分) を含む DNA 断片をプラスミド pdBPV-1(104) の 8.4 kb *Hind*III-*Pvu*II 断片と接続することによって構築した (図 3) 。また、プラスミド pdKCR- α 5 の混成遺伝子部分を pdBPV-1 の 8.4 kb *Hind*III-*Pvu*II 断片と接続したプラスミドも同時に構築し、これを pFN α 5 とした (図 3) 。このようにして構築したプラスミド pFN γ , pFN α 5 は、IFN 発現用の混

成遺伝子，大腸菌プラスミド pML-2 の複製開始部位と β -ラクタマーゼ遺伝子（アンピシリン耐性遺伝子），BPV-1 ゲノムの 5.4-kb *HindIII*-*Bam*HI 領域（69 % BPV）などから成っている。マウス細胞のトランスホメーションおよび染色体外環状 DNA の維持には、この 69 % BPV 領域のみで十分であることが知られている (101,104)。

7、マウス C127 細胞のトランスホメーションと IFN 産生細胞の単離

大腸菌プラスミド由来の DNA が BPV-DNA に接続されていると、BPV のトランスホメーション作用が阻害される場合がある (104)。そこで、マウス細胞に導入する DNA は、大腸菌プラスミドの DNA 配列を極力除いたものを用いることにした。それぞれ 10 μ g のプラスミド pFN γ ，pFN α 5，pdBPV-1 を *Bam*HI で消化して pML-2 由来の DNA 領域（図 3 の破線部分）を切除した後、リン酸カルシウム共沈法によってマウス C127 細胞（ 7×10^5 細胞；6 cm プラスチックペトリ皿）へのトランスフェクションを行った。12 時間後にトリプシンで細胞をはがし、それぞれ 3 枚の 6 cm プラスチックペトリ皿に継代した後、3～4 日毎に培地を新しく交換しながら培養を続けた。トランスホーム細胞によって形成されるフォーカスは 7 日後より観察されるようになり、16 日後には直径約 1～2 mm に達した。導入した組み換え DNA によるフォーカス形成効率を表 5 に示した。pFN γ および pFN α 5 のフォーカス形成効率は、直鎖状の BPV-1 全ゲノム DNA（pdBPV-1）のそれに比べてかなり低く、それぞれ約 1/14，1/23 であった。マウス IFN を作用させた C127 細胞では BPV-1 のトランスホーム作用が阻害されることが報告されており (102)、pFN α 5 を導入した細胞の場合には、組み換え遺伝子から発現したヒト IFN- α 5 の作用によってトランスホメーションが抑制される可能性が考えられた。しかし、pFN α 5 を導入したのち抗ヒト IFN- α 抗体の存在下に細胞を維持した場合も、フォーカス形成率の顕著な上昇は認められなかった（表 5）。また、ヒト IFN- γ はマウス細胞に対する交叉活性を示さないにもかかわらず pFN γ の効率も同様に低いことから、IFN の作用によってトランスホメーションが阻害されたとは考えにくい。むしろ、pFN γ ，pFN α 5 のトランスホメーション効率が低いのは、BPV-1 ゲノムの 2.2-kb

表5．BPV-IFN 組み換え体によるマウスC127 細胞のトランスホメーション

DNA	フォーカス数 (foci/10 μ g DNA)
pdBPV-1	470
pFN γ	33
pFN α 5	
+ 抗 IFN- α 抗体	30
- 抗体	20

pdBPV-1, pFN γ , pFN α 5 の各プラスミドを *Ban*HI で切断したDNA を用いてマウスC127 細胞にトランスフェクションし、16 日後のフォーカス数を計測した。

*トランスフェクション以後、0.5 %の抗ヒトIFN- α 抗血清を含む培地を用いて培養を続けた。これは、100 IU/ml のヒトIFN- α を1 IU/ml に低下させる抗体濃度である。

*Hind*III-*Pvu*II 領域を欠いているためではないかと思われる。この領域は、トランスホメーションに必須ではないが、その効率を上げる働きを持っていることが示唆されている(104,186)。あるいは、SV40, IFN, β -グロビンなどに由来するDNA 領域の中にBPV-DNA のトランスホーム活性に阻害的に働く配列が存在するのかもしれない。

pFN γ を導入した細胞のフォーカスを74 個単離し、F γ 1 細胞, F γ 2 細胞, …, …, F γ 74 細胞として株化した。同様に、pFN α 5 やpdBPV-1 を導入した細胞のフォーカスも各々42 個, 16 個ずつ単離し、それぞれF α 1 細胞, …, F α 42 細胞, FV1 細胞, …, FV16 細胞とした。これらトランスホーム細胞がIFN を構成的に産生しているかどうかを調べるために、各細胞株の培養上清中の抗ウイルス活性をヒトGM2504 細胞を用いて測定した。表6 に示すように、pdBPV-1 でトランスホームした細胞の培養上清中には抗ウイルス活性は全く検出されなかったのに対し、pFN γ あるいはpFN α 5 でトランスホームした全ての細胞株では、その培養上清

表6．トランスホーム細胞におけるヒトIFN 産生

IFN activity		Number of cell lines		
x 10 ² IU/ml		FVs	Fγs	Fαs
<	2	16	0	0
2	— 10	0	11	10
10	— 50	0	17	17
50	— 250	0	23	13
250	<	0	5	2

pdBPV-1, pFNγ, pFNα 5 でC127 細胞をトランスホームして得られた細胞株（FV 系の16個, Fγ 系の56個, Fα 系の42 個）をそれぞれ24 ウェルのマイクロプレートで培養した。細胞密度がコンフルエントに達した後、新しい培地に交換して、さらに培養を続けた。48 時間後、各培養上清を採取してIFN 活性を測定した。培養上清中のIFN 力価を5 段階に分け、細胞株の数（度数）を示した。

中に有意なIFN 活性が認められた。ただし、そのIFN 力価は細胞株によって大きく異なり、低いもので数百 IU/ml、高いものでは数万 IU/ml の値を示した。以後は主に、IFN 産生量の高いトランスホーム細胞（Fγ 56, Fγ 66, Fα 6, Fα 28など）について解析を行った。

8. 組み換えDNA の存在状態

BPV-1 ベクターを用いて導入したDNA は、一般に、トランスホーム細胞内で染色体に組み込まれることなく染色体外環状DNA として存在することが知られている(98~100,104)。そこで、ヒトIFN 遺伝子を発現しているトランスホーム細胞内におけるBPV 組み換え体の存在状態とコピー数をSouthern プロットハイブリダイゼーションによって解析した。まず、IFN 産生量の高い細胞株（Fγ 系, Fα 系各6 株ずつ）およびコントロールの細胞株（FV系2 株）から調製した全細胞DNA を制限酵素で消化しない状態で電気泳動し、pdBPV-1 をプローブにしてプロットハイブリダイゼーションを行ったところ、ひとつの株（Fγ 66 細胞）では染色体由来の高分子

量DNA (>100kb) の位置にハイブリダイゼーションのバンドが認められたが、他の全ての細胞株では比較的分子量の小さいDNA として存在していることが示された(データは省略する)。さらに詳細に調べるために、4つの細胞株(FV10, F γ 56, F γ 66, F α 28) のDNA を未消化のまま、あるいは制限酵素で消化したのち、Southern プロットハイブリダイゼーションを行った(図9)。FV10 細胞, F γ 56 細胞, F α 28 細胞では、未消化DNA で見出されるバンド移動度が *Hind*III 消化DNA のバンドのそれよりも大きかった(レーン4と5, 7と8, 13と14)。これは、

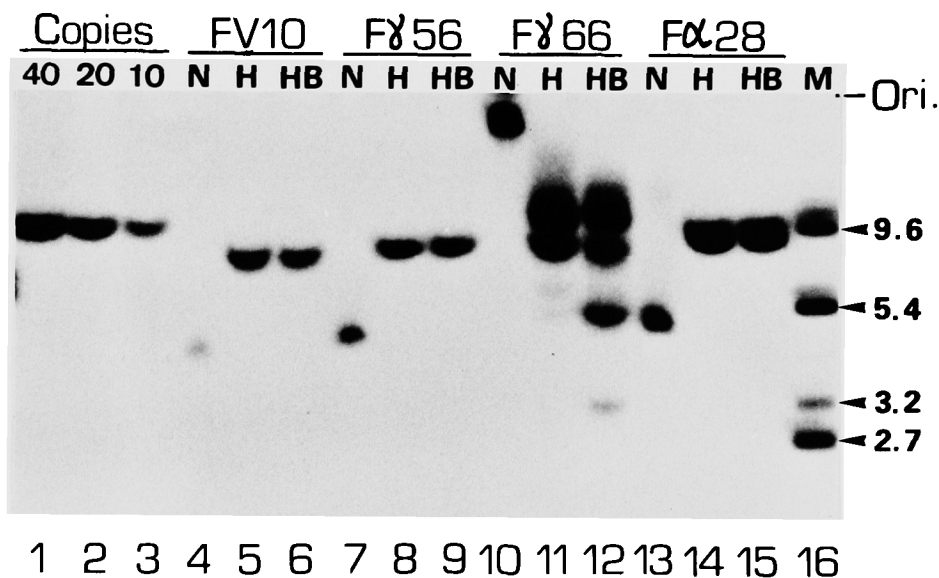


図9. トランスホーム細胞内の組み換えDNA 存在状態のSouthern ハイブリダイゼーションによる解析

FV10細胞(レーン4~6), F γ 56 細胞(レーン7~9), F γ 66 細胞(レーン10~12), F α 28 細胞(レーン13~15)から抽出した全細胞DNA(各10 μ g)を適宜制限酵素で消化した後、「材料と方法」-21, 22に述べた方法でSouthern ハイブリダイゼーションを行った。プローブは、プラスミドpdBPV-1, pFN γ , pFN α 5を等モル数ずつ混合したものを³²Pで標識して用いた。レーン5, 8, 11, 14には *Hind*III 単独消化, レーン6, 9, 12, 15には *Hind*III-*Bam*HI 二重消化のDNAを泳動した。レーン4, 7, 10, 13には、抽出したDNAをそのまま(未消化で)泳動した。また、10 μ gのC127細胞DNAにプラスミドpdBPV-1をそれぞれ600 pg(レーン1), 300 pg(レーン2), 150 pg(レーン3)ずつ加えた後 *Hind*IIIで消化したものを、コピー数標準試料として泳動した。この場合、10 μ gのC127細胞DNAあたり15 pgのpdBPV-1 DNAを加えたときに二倍体ゲノムあたり1コピーに相当する。レーン16には、*Bam*HIで消化したpFN α 5と *Bam*HI-*Hind*IIIで二重消化したpFN γ を混合したものをサイズマーカーとして泳動した。マーカーDNAのサイズは、キロ塩基対で表示した。

導入したBPV 組み換え体がこれらのトランスホーム細胞において染色体外のスーパーコイル閉環状DNA として存在していることを示している。また、*Hind*III 消化、*Hind*III-*Bam*HI 消化のどちらの場合にも、F γ 56 細胞では8.6 kb, FV10 細胞では7.9 kb のそれぞれ単一のバンドが見出されるのみであった。したがって、細胞内の小環状組み換え体はトランスフェクションに用いた直鎖状DNA とほぼ同じサイズを有しているものの、両端の*Bam*HI 部位は環化の際に再生されなかったと考えられる。また、F α 28 細胞のBPV 組み換え体は約8.8 kb であり、導入したDNA (9.6 kb) に0.8 kb ほどの欠損が生じたことが示唆された。

他方、F γ 66 細胞のDNA は、制限酵素で切断しない試料では宿主の高分子量DNA の位置にバンドを与え(レーン10)、*Hind*III 消化によって10.8, 8.4, 6.4 kb の強いバンドと5.2, 4.3 kb の弱いバンドを生じた(レーン11)。*Hind*III と*Bam*HI による二重消化ではこれらに加えて更に5.4 kb と3.2 kb のバンドが新たに現れた(レーン12)。これらの結果は、F γ 66 細胞ではBPV-IFN 組み換えDNA が何個か直結した状態で宿主染色体内に組み込まれていることを示している。

*Hind*III 消化で生じたバンドの強さを既知量のプラスミドDNA (レーン1～3) の与えるバンドの強さと比べることによりBPV-DNA のコピー数を計算することができる。トランスホーム細胞におけるBPV 組み換え体のコピー数は、いずれの株においても細胞あたり30～50 コピーであった。

9. トランスホーム細胞による組み換え IFN の生産とその生理活性

トランスホーム細胞による組み換え IFN の生産条件を検討するために、F γ 56 細胞とF α 28 細胞について細胞増殖とIFN 産生量を調べた(図10)。F γ 56 細胞およびF α 28 細胞の倍加時間はそれぞれ20.3 時間, 27.0 時間であり、親株のC127 細胞(倍加時間=30時間)より増殖が速くなっていた。また、細胞増殖が停止した時点における細胞密度は、F γ 56 細胞では 4×10^5 cells/cm², F α 28 細胞では 3×10^5 cells/cm² であり、親株のC127 細胞 ($5 \sim 7 \times 10^4$ cells/cm²) に比べてかなり高密度にまで増殖することが示された。これらの性質は、Turek らが報告しているC127 細胞由来のBPV-1-トランスホーム細胞の性質(102)とよく合っている。

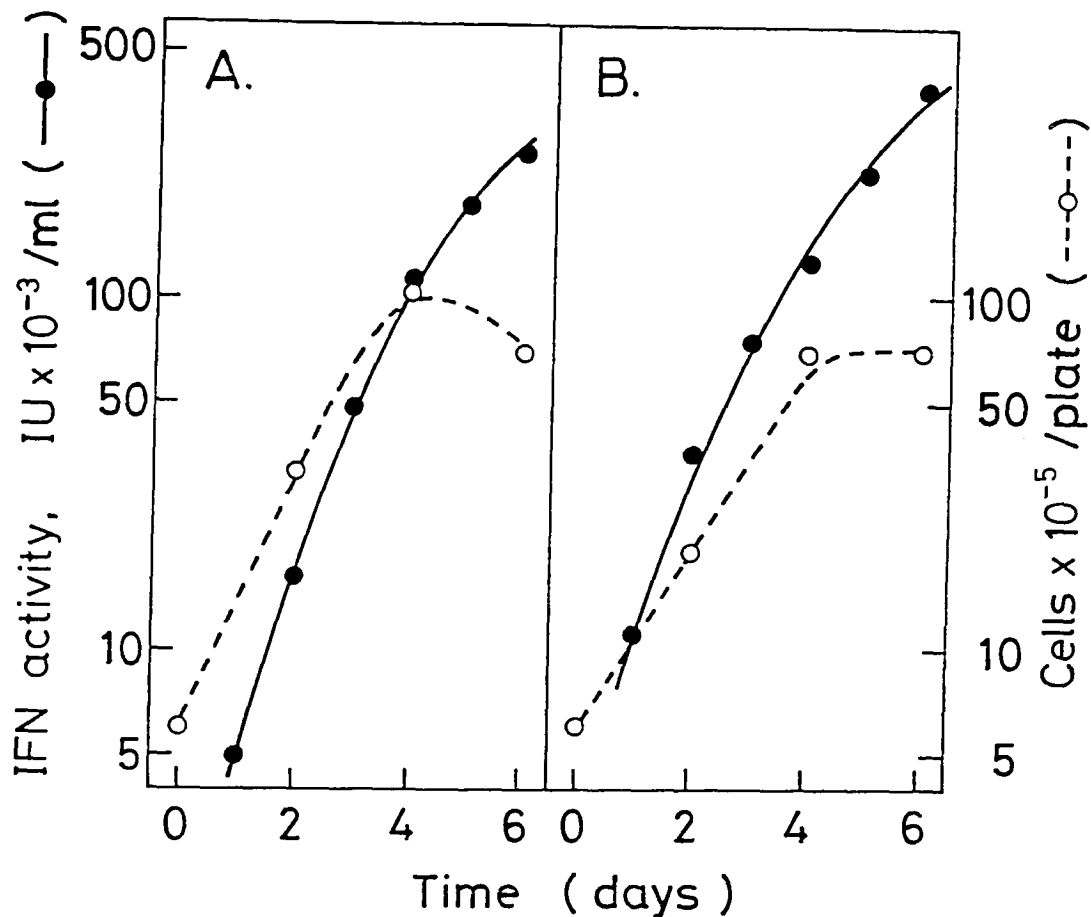


図10. トランスホーム細胞によるIFN 産生の経時変化

数枚のペトリ皿 (5 cm) にFγ 56 細胞 (A) あるいはFα 28 細胞 (B) を 5×10^5 cells/ml の密度で植え継いで12 時間培養した後、古い培地を捨て新しい培地に交換した (この時点を0 時間とした)。経時的に培養上清中のIFN 活性を測定し、また、トリプシンで細胞を剥がして細胞数を計測した。

図10 に示すように、これらトランスホーム細胞の培養上清中のIFN 活性は、細胞増殖に伴って急激に上昇し、細胞密度が飽和した4 日め以後もさらに増加し続けた。6 日間培養後のIFN 力価は、Fγ 56 細胞で 3×10^5 IU/ml, Fα 28 細胞で 4×10^5 IU/ml に達した。図11 は、セミ-コンフルエントにまで培養した細胞を異なる血清濃度の培地で維持した時のIFN 産生量を示したものである。Fγ 56 細胞では血清濃度が1 %でも10 %の場合とほぼ同じ産生量が得られたが、無血清培地で維持した場合には6 割程度の産生量になった。Fα 28 細胞では血清濃度を1 %, 0 %にすると10 %の場合にくらべてそれぞれ約1/2, 1/4 に低下した。したがって、高収

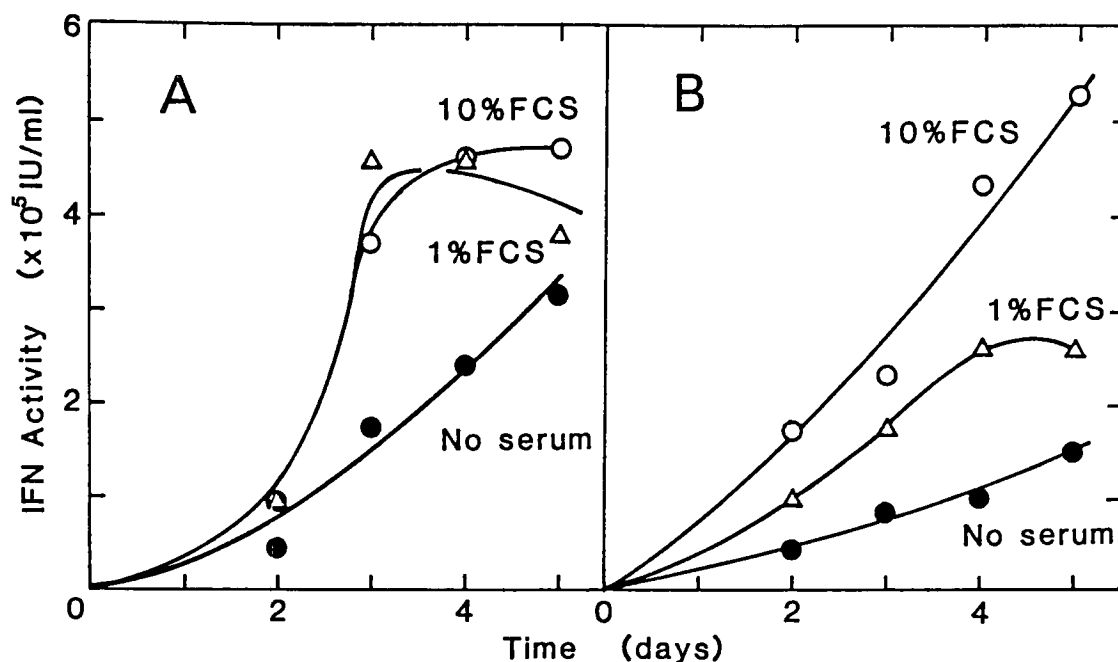


図11. 組み換え IFN 産生量に対する血清濃度の影響

数枚のペトリ皿 (5 cm) に Fy 56 細胞 (A) あるいは Fa 28 細胞 (B) を 5×10^5 cells/ml の密度で植え継ぎ、セミコンフルエントに達するまで培養 (3 日間) した。古い培地を捨て、細胞を PBS(-) で 3 回洗浄した後、異なる濃度のウシ胎児血清を含む新しい培地に交換した (この時点をも 0 時間とした)。経時的に培養上清を採取し、IFN 活性を測定した。

量の IFN を得るためには少なくとも 1 パーセント程度の血清を添加したほうが良い。Fy 56 細胞と Fa 28 細胞は、少なくとも 4 か月 (20 継代) 以上に渡って高力価の IFN を産生する性質を維持していた。

Fy 56 細胞, Fa 28 細胞などのマウス細胞で産生した IFN が実際にヒト IFN としての生物学的性質を有しているか否かを、種特異性および抗原性の二つの点に関して調べた。表 7 は、いくつかのトランスホーム細胞株の培養上清とその他のヒト IFN 標品についてヒト FL 細胞あるいはマウス L 細胞に対する抗ウイルス活性を測定した結果である。pdBPV-1 でトランスホームした FV10 細胞の培養上清は、ヒト、マウスのいずれの細胞に対する抗ウイルス活性も有していなかった。また、ヒト細胞に対して 2×10^5 IU/ml の IFN 活性を示す Fy 56 細胞培養上清中にも、マウ

表 7 . いろいろな IFN 試料のヒト細胞またはマウス細胞に対する抗ウイルス活性

IFN 標品	抗ウイルス活性 (IU/ml)	
	ヒト F L 細胞	マウス L 細胞
FV10	<10	< 10
天然 IFN- γ	5,700	< 10
F γ 56	200,000	< 10
大腸菌 IFN- α 5	78,000	< 10
F α 28	240,000	1,300
F α 6	78,000	250

天然ヒト IFN- γ としては、表 1 の脾細胞 IFN を用いた。大腸菌由来ヒト IFN- α 5 は、IFN- α 5 cDNA 発現プラスミドを有する大腸菌 (50,197) の無細胞抽出液を酸処理 (187) して調製した。

ス細胞に対する抗ウイルス活性は全く検出されなかった。このことは、F γ 56 細胞の培養上清中の抗ウイルス活性が、細胞に導入したヒト IFN 遺伝子産物に由来しており、宿主染色体のマウス IFN 遺伝子によるものではないことを示している。IFN- γ は、特に種特異性が高いことが知られており、実際、ヒト脾リンパ球で生産した IFN- γ (これを天然ヒト IFN- γ と称することにする) はマウス細胞に対する交叉活性を示さなかった。一方、ヒト細胞に対してそれぞれ 2.4×10^5 , 7.8×10^4 IU/ml の IFN 活性を示す F α 28 細胞および F α 6 細胞の培養上清は、マウス細胞に対しても低いながらも明らかな抗ウイルス活性を有していた。これは、ヒト IFN- α 5 がマウス細胞にもある程度作用し得るためであると考えられる。しかし、大腸菌で生産したヒト IFN- α 5 (32,187) はそのような交叉活性を示さなかった。

さらに、組み換え IFN の抗原性を調べるために、抗 IFN 抗体を用いた中和試験を行った (表 8)。F γ 56 細胞の培養上清中の抗ウイルス活性は抗ヒト IFN- γ 抗体によって天然ヒト IFN- γ と同程度に中和されたが、抗ヒト IFN- α 抗体では中和されなかった。逆に、大腸菌由来ヒト IFN- α 5 および F α 28 細胞培養上清の抗ウイルス活性は、抗ヒト IFN- α 抗体によってのみ中和された。これらの結果は、F γ 56 細胞、

表 8 . 組み換えヒト IFN の中和試験

Source	IFN activity (IU/ml)		
	Control	+anti-IFN- α	+anti-IFN- γ
Natural IFN- γ	4,000	3,400 (85)	130 (3.3)
Fy56	130,000	130,000 (100)	2,100 (1.7)
<u>E.coli</u> IFN- α 5	63,000	630 (1.0)	51,000 (81)
F α 28	260,000	1,900 (0.7)	220,000 (85)

4 種の IFN 標品の抗ウイルス活性を、一定濃度の抗ヒト IFN- α 抗体、抗ヒト IFN- γ 抗体の存在下に測定した。括弧内の数字は抗体存在下の残存活性を示す。

F α 28 細胞が分泌しているのが確かにヒトの IFN であってマウスのそれではないことを示している。表 8 の結果では、マウス細胞由来のヒト IFN- α 5 と大腸菌由来のヒト IFN- α 5 の抗原性の違いは検出されなかったが、抗 IFN- α モノクローン抗体を用いてさらに厳密な解析を行った結果、両者の抗原性には違いがあることが示されている (188) (考察参照)。

10. 組み換え IFN- γ の精製とその分子的性状

Fy 56 細胞で生産したヒト IFN- γ (以下これを組み換えヒト IFN- γ あるいは単に IFN- γ と称することにする) の分子的性質を調べるために、これの高度精製を試みた。精製は原理的に異なる二通りの方法で行った (表 9)。ひとつは Yip らの方法 (69,183) を改変した方法を用い、無血清培地で得た Fy 56 細胞培養上清を出発材料として、Controlled-pore glass (CPG) カラム, DEAE-トヨパールカラム, Con A-Sepharose カラムの三段階の精製操作を行った (方法 I)。この場合、無血清培地を用いることによって培養上清のタンパク質濃度を大幅に低減できたおかげで、比較的簡便に精製することができた。もうひとつの精製法としては、当研究室の宮田らが作製した抗ヒト IFN- γ モノクローナル抗体カラム (73) を用いた (方法 II)。

これは非常に特異性の高い方法であるため、5 % の血清を含む培養上清を出発材料にしても、一段階で精製可能であった（表 9）。これらの精製標品の純度は SDS-電気泳動 (189) によって検定した（図 12 A）。抗体カラムで精製した標品は分子量 24,000~26,000 の位置に幅の広い単一のバンドをあたえ、極めて高度に精製されたことが示された。Con Aカラムで精製した標品も同様のバンドが主要成分であったが、極めてわずかの混入タンパク質と思われるバンド（約 32,000）も見出された。いずれにしろ、これらの精製標品は 90 % 以上の純度であると思われる。表 9 に示すように、精製標品の比活性は方法 I で 7.1×10^7 IU/mg タンパク質であり、方法 II で 7.9×10^7 IU/mg タンパク質であった。これは、宮田らが精製した天然ヒト IFN- γ を用いて測定した比活性（ $4 \sim 12 \times 10^7$ IU/mg タンパク質 (73)）とほぼ等しい数値である。

表 9．2通りの方法による組み換えヒト IFN- γ の精製

	Step	IFN activity ($\times 10^7$ IU)	Protein (mg)	Specific activity (IU/mg)	Recovery (%)
I.	Culture fluid ^{a)}	3.8	105	3.6×10^5	100
	CPG-Adsorption	4.6	16.4	2.8×10^6	120
	DEAE-Toyopearl	4.1	5.78	7.1×10^6	110
	Con A-Sepharose	1.0	0.14	7.1×10^7	26
II.	Culture fluid ^{b)}	3.6	2470	1.5×10^4	100
	mAb-Column	2.0	0.25	7.9×10^7	56

I. F γ 56 細胞の培養上清（無血清培地； 1700 ml）を出発材料として、精製法 I（「材料と方法」-18）によって精製した。

II. F γ 56 細胞の培養上清（5 % FCS 含有培地； 1700 ml）を出発材料として、精製法 II によって精製した。

組み換えヒト IFN- γ の見かけの分子量は、SDS-電気泳動（図 12 A）およびゲルクロマトグラフィー（図 12 B）によって測定した。ヒト IFN- γ の推定アミノ酸配列をもとに計算したポリペプチド鎖部分の分子量は 16,780 である。実際、大腸菌で生産したヒト IFN- γ の分子量は SDS-電気泳動において約 17,000 であった

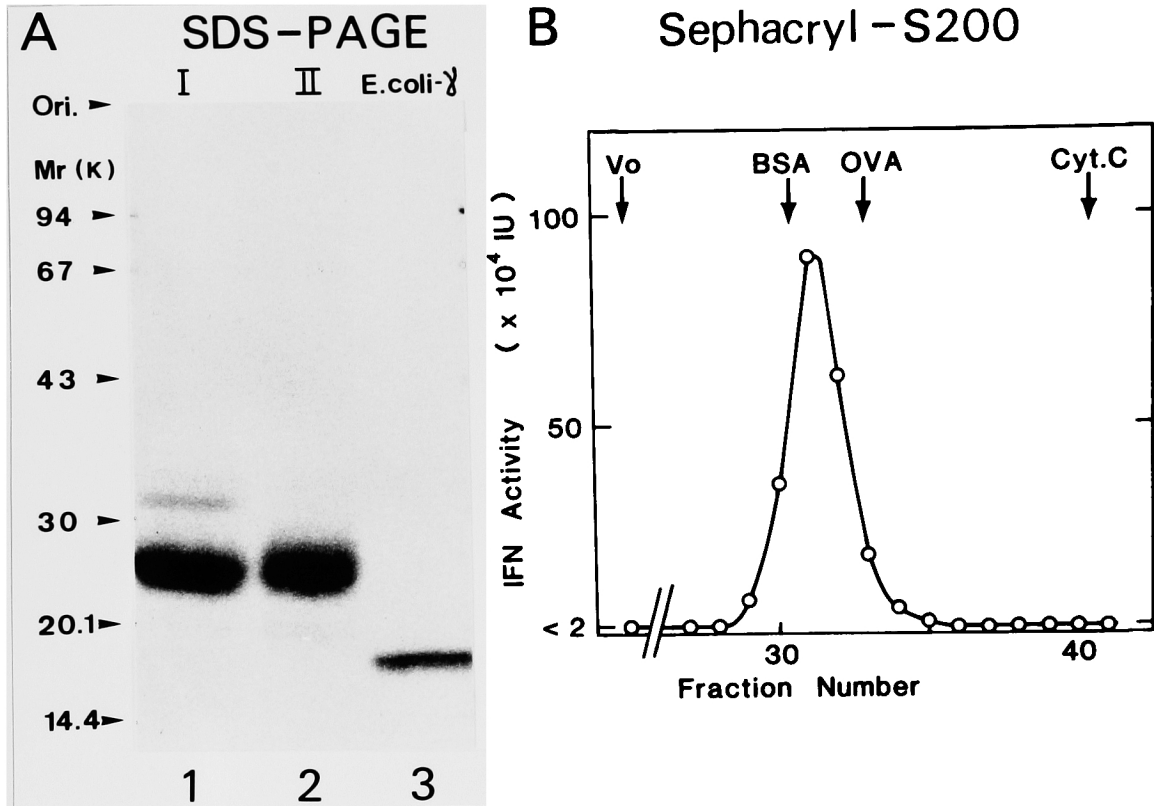


図 12. 組み換えヒト IFN- γ の相対分子量

A. 組み換えヒト IFN- γ 精製標品の SDS- ポリアクリルアミドゲル電気泳動。方法 I（レーン 1）あるいは方法 II（レーン 2）によって精製した F γ 56 細胞由来ヒト IFN- γ および大腸菌由来ヒト IFN- γ の精製標品（レーン 3）をそれぞれ 各 4 μ g ずつ用いて、Laemmli の方法 (189) に従って SDS- 電気泳動を行った。タンパク質の染色は、Coomassie Brilliant Blue R-250 で行った。分子量マーカーとしては、ホスホリラーゼ b（94.0 K）、BSA（67.0 K）、オバルブミン（43.0 K）、カルボニックアンヒドラーゼ（30.0 K）、ソラメトリブシンインヒビター（20.1 K）、 α -ラクトアルブミン（14.4 K）を用いた。

B. Sephacryl S-200 カラムクロマトグラフィー。0.5 M NaCl, 0.1 mM EDTA を含む 20 mM リン酸ナトリウム緩衝液（pH 7.5）で平衡化した Sephacryl S-200 のカラム（ ϕ 1.0 cm x 74 cm）に 70 μ g の組み換えヒト IFN- γ 精製標品（方法 I）をかけ、同緩衝液を用いて流速 2.0 ml/hr で溶出した。1.0 ml ずつ分画し、IFN 活性を測定した。分子量マーカーとしては、BSA（67.0 K）、オバルブミン（OVA, 43.0 K）、チトクローム C（Cyt.C, 12.5 K）を用いた。Vo は Blue Dextran（ファルマシア）の溶出位置を示す。

(図12 A, レーン3)。これに比べてマウス細胞で生産した組み換えヒトIFN- γ の分子量はかなり大きく、SDS-電気泳動で約24,000～26,000であった。調製標品によっては、22,000～25,000の値を示す場合もあった(105)。また、このネイティブな分子量をSephacryl S-200のゲルクロマトグラフィーによって測定したところ、IFN活性は分子量約58,000の位置に単一のピークを与えた(図12 B)。これらの測定値は、天然ヒトIFN- γ の見かけの分子量(SDS-電気泳動において25K, 20K, 15K; ゲルクロマトグラフィーにおいて45K～58K)(68～73,183)とよい一致を示している。

マウス細胞で生産したヒトIFN- γ がCon A-Sepharose カラムに特異的に結合すること、また、SDS-電気泳動における見かけの分子量が約25Kであることは、この組み換えIFN- γ が糖鎖構造を有していることを示している。また、ネイティブな分子量が約58Kであることから、組み換えヒトIFN- γ も溶液中では天然のIFN- γ と同様おそらく二量体として存在(73,183)していることが示唆された。

11. 組み換えヒトIFN- γ のNH₂-末端アミノ酸の同定

天然のヒトIFN- γ は、そのNH₂-末端のグルタミン残基がピログルタミン酸に環化し、いわゆるブロック構造をとっていることが知られている(72,73)。マウス細胞で生産した組み換えヒトIFN- γ が天然のそれと同様のプロセッシングを受けているかどうかを調べるために、NH₂-末端アミノ酸配列の決定を試みた。まず、二通りの方法で精製した組み換えヒトIFN- γ のそれぞれの標品をそのまま気相エドマン法(175～177)による自動アミノ酸配列解析に供したが、有意な収量のアミノ酸(PTH-アミノ酸)は検出されなかった。これは、組み換えヒトIFN- γ もそのNH₂-末端がブロックされていることを示唆している。そこで次に、組み換えIFN- γ 精製標品をピログルタミン酸アミノペプチダーゼ(NH₂-末端ピログルタミン酸残基を特異的に消化する)で処理してから同様の解析に供したが、やはり有意な収量のPTH-アミノ酸は検出できなかった。この原因として、ネイティブなIFN- γ 標品では酵素が作用しにくいためではないかと考えられた。

もし、組み換えIFN- γ が天然のそれと同じNH₂-末端構造をとっているのならば、

トリプシン消化によってNH₂-末端から生じるペプチド断片の配列は <Glu-Asp-Pro-Tyr-Val-Lys となっているはずである（図8参照）。そこで、組み換え IFN- γ

表10. NH₂-末端アミノ酸配列の解析

a .

cycle	A	pmol	B	pmol	C	pmol
1	Phe	410	Tyr	225	Asp	38
2	Phe	256	Val	129	Pro	55
3	Asn	113	Lys	58	Tyr	38
4	Ser	101			Val	53
5	Asn	119			Lys	14
6	Lys	143				
7						

b .

アミノ酸	収率 (実測値)	予想アミノ酸組成*		
		ペプチドA	ペプチドC	計
	nmol	nmol	nmol	nmol
Asp	4.30	1.92(2)	2.12(1)	4.04
Ser	0.97	0.96(1)		0.96
Glu	2.32		2.12(1)	2.12
Val	2.07		2.12(1)	2.12
Tyr	1.99		2.12(1)	2.12
Phe	1.92	1.92(2)		1.92
Lys	3.22	0.96(1)	2.12(1)	3.08

a . トリプシン消化ペプチドのアミノ酸配列解析。トリプシン消化ペプチドを逆相HPLCのカラムのかけ、合成ペプチド(<Glu-Asp-Pro-Tyr-Val-Lys)と同じ位置に溶出する画分を回収した。このうちの一部をピログルタミン酸アミノペプチダーゼで処理した後、気相エドマン法によってアミノ酸配列を決定した。

b . トリプシン消化ペプチドのアミノ酸組成。(a)と同じ逆相HPLC画分を用いて、アミノ酸分析を行った。

* 0.96 nmol のペプチドAと2.12 nmol のペプチドCが混在すると仮定した場合に予想されるアミノ酸組成。カッコ内はペプチドのアミノ酸組成を示す。

のトリプシン消化物の中にこのペプチドが存在するかどうかを検討した。まず、抗体カラムで精製した組み換えヒト IFN- γ (0.1 mg) を TPCK 処理トリプシンによって消化し、これを逆相 HPLC カラムにかけてペプチドを分画したところ、40 個のピークが検出された。また、これとは別に <Glu-Asp-Pro-Tyr-Val-Lys の配列を持つ化学合成ペプチドを用意し、同じ条件下の逆相 HPLC における溶出位置を決定した。先のトリプシン消化ペプチドのクロマトグラムにおいてこの合成ペプチドと同じ位置に溶出するピークを同定し、これを回収した。このピーク画分の 2/3 をピログルタミン酸アミノペプチダーゼで処理した後、アミノ酸配列の解析を行った (表 10 a)。残りの 1/3 は酸加水分解 (6 N HCl, 減圧封管中 110 °C, 24 時間) を行った後、アミノ酸分析に供した (表 10 b)。アミノ酸配列解析の結果は、この試料には少なくとも 3 種類のペプチド (ヘキサペプチド, ペンタペプチド, トリペプチド) が混在していることを示している。アミノ酸配列解析およびアミノ酸分析の結果をヒト IFN- γ の推定アミノ酸配列 (図 8) から予想されるトリプシン消化ペプチドと照合した結果、このピーク画分には 2 種類のヘキサペプチドが混在していると結論することができた。すなわち、アミノ酸分析に用いた試料には、推定アミノ酸配列の 1 ~ 6 番 (<Glu- Asp-Pro-Tyr-Val-Lys; ペプチド C とする) および 84 ~ 89 番 (Phe-Phe-Asn-Ser-Asn-Lys; ペプチド A とする) に相当するペプチドがそれぞれ 2.12 nmol, 0.96 nmol ずつ含まれていたと考えられる (表 10 b)。このペプチド A は、アミノ酸配列解析において主要成分として検出されており、収率は 21 % であった。他の 2 成分のうちのひとつはペプチド C の NH₂-末端のピログルタミン酸残基が酵素によって除去されて生じたペプチド (2 ~ 6 番; Asp-Pro-Tyr-Val-Lys) であり、もうひとつは同じ NH₂-末端ペプチドの 4 ~ 6 番に相当する配列 (Tyr-Val-Lys; ペプチド B) であると考えられる (表 10 a)。しかし、両者をあわせても収率は約 7 % と低く、また、アミノ酸分析で明確に検出されたアミノ酸のうちグルタミン酸 (Glu または Gln 由来) だけは、アミノ酸配列解析で全く検出されなかった。これらの結果は、この試料の中に NH₂-末端ピログルタミン酸残基を有するペプチド C が存在することを示している。ペプチド B は、酵素処理などの一連の操作過程においてペプチド C のプロリン残基の後で切断されて生じたと思われるが、

その生成機構は不明である。

12. 組み換えヒト IFN- α 5 の分子量

F α 28 細胞で生産した組み換えヒト IFN- α 5 の分子量を調べるために、細胞を ^{35}S -メチオニン存在下に培養して放射活性 IFN- α 5 を調製した。これをウサギ抗ヒト IFN- α 抗体 (138) とプロテイン A 吸着体を用いて精製し、SDS-電気泳動で解析した (図 13)。コントロールの FV10 細胞からは放射活性を有する免疫沈降物は認められなかった (レーン 2)。これに対し、F α 28 細胞の培養上清からは見かけの分子量が $19,000 \pm 500$ の単一のバンドが検出された (レーン 3)。ヒト IFN- α 5 の推定アミノ酸配列から計算した前駆体および成熟タンパク質の分子量はそれぞれ 21,800, 19,550 (93) であることから、マウス細胞で生産したヒト IFN- α 5 も天然のそれと同様のプロセッシングを受けていることが示唆された。

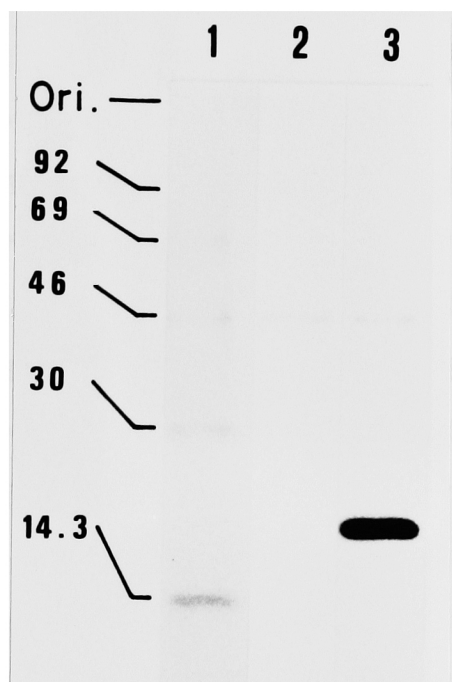


図 13. 組み換えヒト IFN- α 5 の相対分子量

^{35}S で標識した FV10 細胞 (レーン 2), F α 28 細胞 (レーン 3) の培養上清にウサギ抗ヒト IFN- α 抗体を加えてプロテイン A 吸着体を用いて免疫沈降操作 (「材料と方法」-20) を行った。生じた沈降物の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (189) を行い、EN-LIGHTNING (New England Nuclear) を増感剤としてフルオログラフィーを行った。レーン 1 には、 ^{14}C -標識分子量マーカーセット (Amersham, No. CFA626) を泳動した。

第3部、ヒト IFN- γ 遺伝子近傍のメチル化レベルの解析

13、末梢血 T リンパ球に特異的に見出される IFN- γ 遺伝子の低メチル化

いろいろなヒト正常細胞や細胞株における IFN- γ 遺伝子のメチル化状態を解析するために、筆者らは CCGG 配列を認識・切断する2種類の制限酵素（イソシゾマー）を用いた。ひとつは内側のシトシン残基がメチル化されている DNA（CmCGG）を切断できない制限酵素 *HpaII* で、もうひとつは CmCGG 配列をも切断できる制限酵素 *MspI* である。ヒト IFN- γ 遺伝子近傍の *PvuII* および *HpaII* の制限酵素地図を図 14 A に示した。Gray らの発表した制限酵素地図 (78) だけでは本研究の解析に不十分だったので、クローン化したヒト IFN- γ 遺伝子 DNA を用いて、新たに遺伝子周辺（flanking region）の1個の *HpaII* 部位と2個の *PvuII* の位置を決定した。この領域にある4ヶ所の *HpaII* 部位を5'側より順に M1, M2, M3, M4 部位と呼ぶことにし、以下、これらの CCGG 配列におけるメチル化の程度を解析した。*HpaII* の他にもメチルシチシン感受性の制限酵素として *SalI*, *XhoI*, *HhaI* などが知られているが、これらの制限酵素部位はこの遺伝子領域には見出されなかった。

まず初めに、ヒト正常組織由来の細胞として末梢血リンパ球と子宮組織の DNA における IFN- γ 遺伝子のメチル化パターンを調べることにした。末梢血リンパ球はプラスチック付着性細胞（plastic dish-adherent cells）, T細胞（T cells）, 非 T細胞（non-T cells）の3つの細胞画分に分画したものを用いた。それぞれの細胞から抽出した全細胞 DNA を制限酵素で完全消化した後アガロースゲルの電気泳動を行い、 ^{32}P で標識したプラスミド pBRIF γ （ヒト IFN- γ cDNA の 0.84 kb *Sau3AI* 断片を含む）をプローブとして Southern ハイブリダイゼーションを行った。Southern ハイブリダイゼーションのバンドの長さから、各 CCGG 配列のメチル化の程度を見積もることができる。CCGG 配列のいろいろなメチル化パターンに応じて生じる DNA 切断断片の長さは図 14A の下段に示した。図 14 B に *PvuII* と *HpaII* の二重消化の、図 14 C には *HpaII* または *MspI* による単独消化の Southern ハイブリダイゼーションの結果を示した。制限酵素地図から予想されるように、*MspI* 消化では 3.0 kb, 2.6 kb, 1.0 kb の3本の DNA 断片が IFN- γ cDNA とハイブリダイズした（レーン5）。

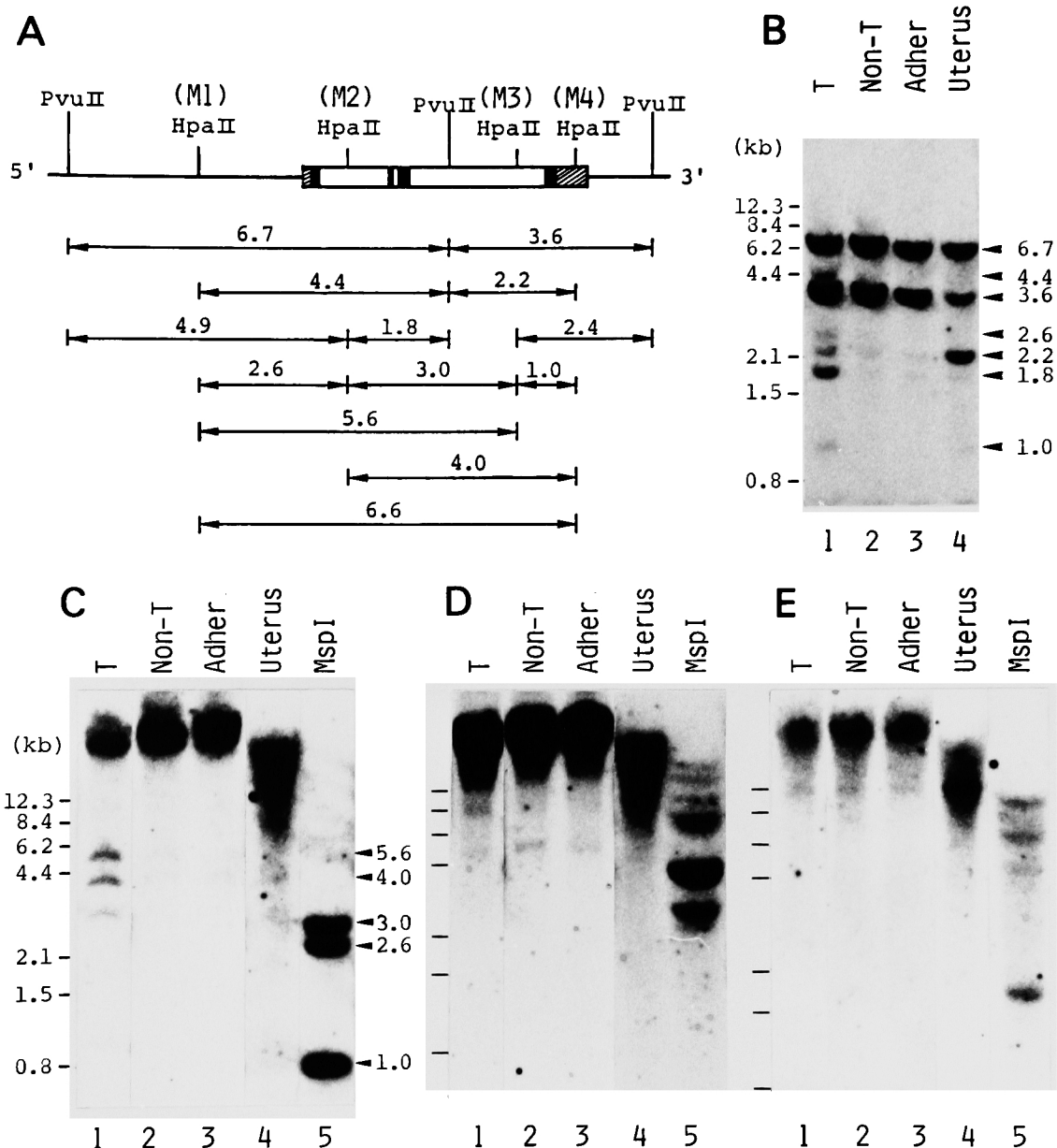


図14. ヒト正常細胞におけるIFN- γ 遺伝子のメチル化パターン

A. ヒトIFN- γ 遺伝子の制限酵素地図。4つの黒枠はエクソン部分を、3つの白枠はイントロン部分を表す。また、斜線枠は5'側および3'側の非コード領域を示す(78)。制限酵素地図の下に示した太線は、Southernハイブリダイゼーションのプロープに用いたcDNA領域である。その下に、制限酵素消化によって生じるDNA断片の位置と長さ(kb)を示した。上の4本がHpaII-PvuII二重消化、下の3本がHpaII単独消化で生じるDNA断片である。

B. ヒトT細胞画分(レーン1)、非T細胞画分(レーン2)、プラスチック付着細胞画分(レーン3)、子宮組織(レーン4)から抽出したDNAをHpaIIとPvuIIで二重消化し、 32 Pで標識したIFN- γ cDNA(プラスミドpBRIF γ)をプローブとしてSouthernハイブリダイゼーションを行った。

C, D, E. HpaIIで単独消化したDNA(レーン1~4, DNA試料はパネルAに同

じ)、および、*MspI* で消化したT細胞画分DNA (レーン5) のSouthern ハイブリダイゼーション。プローブには、IFN- γ cDNA (プラスミドpBRIF γ , パネルC), IFN- α 1 cDNA (プラスミドHif-2h, パネルD), γ -グロビンcDNA (プラスミドJW151, パネルE) を用いた。IFN- γ cDNA とハイブリダイスするバンドのサイズ (kb) をパネルB, Cの右側に示した。パネルの左にはサイズマーカーの位置を示した。

非T細胞DNA とプラスチック付着性細胞DNA の*HpaII* 消化では50 kb 以上のDNA断片のみがハイブリダイズした (図14 C; レーン2, 3)。さらに、*HpaII*-*PvuII* 二重消化では、6.7 kb と3.6 kb のバンドだけが検出された (図14 B; レーン2, 3)。この結果は、これらの細胞ではIFN- γ 遺伝子の4つのCCGG 配列が全てメチル化されていることを示している。

一方、IFN- γ 産生細胞を含むと考えられるT細胞画分のDNA の*HpaII*-*PvuII* 消化では、6.7 kbと3.6 kb の強いバンドに加えて4.4 kb, 2.6 kb, 2.2 kb, 1.8 kb, 1.0 kb の弱いバンドが認められた (図14 B, レーン1)。このことは、T細胞画分の大部分の細胞ではそのIFN- γ 遺伝子が高度にメチル化されているものの、ごく一部の細胞では4つのCCGG 配列のどれか一つまたは複数がメチル化されていない状態にあることを示している。さらに、*HpaII* 単独消化において5.6 kb (M1部位とM3部位の同時切断で生じる; M1/M3 と表す), 4.0 kb (M2/M4), 3.0 kb (M2/M3) のバンドが認められる事実は、IFN- γ 遺伝子の二つ以上のCCGG 配列が同時に非メチル化されている細胞が存在することを示している (図14 C, レーン1)。

子宮組織のDNA では、M4部位が部分的に非メチル化状態にあった (図14 B, 2.2 kb バンド) が、3ヶ所のCCGG 配列 (M1, M2, M3) は高度にメチル化されていた。

以上の結果から、IFN- γ 遺伝子はT細胞のある一部のサブセットにおいてのみ遺伝子領域全体にわたって低メチル化状態をとっていることが示された。そこで、T細胞サブセットにおける低メチル化状態がIFN- γ 遺伝子に特異的な現象であるかどうかを調べるために、IFN- γ とは遺伝子発現の組織特異性を異にするIFN- α 遺伝子

と γ -グロビン遺伝子のメチル化パターンをSouthern ハイブリダイゼーションによって解析した。図14 DおよびEに示すように、これらの遺伝子領域のCCGG 配列はどの細胞種においても高度にメチル化されており、*MspI* 消化で見出されるバンドは*HpaII* 消化では全く検出されなかった。この結果は、T細胞のDNA が一般に低メチル化状態をとりやすい傾向にあるのではないことを示している。

14. Tリンパ系株化培養細胞におけるIFN- γ 遺伝子の低メチル化状態

先に調べた正常T細胞画分はいろいろな種類の細胞を含んでおり、IFN- γ 産生細胞だけを取り出してIFN- γ 遺伝子のメチル化パターンを調べることは困難である。DNA メチル化とIFN- γ 遺伝子発現の関係を均一な細胞集団で解析するために、IFN- γ 産生能の異なる種々のヒト株化培養細胞を用いてIFN- γ 遺伝子のメチル化パターンを調べることにした。実験には、ヒト正常Tリンパ球をhuman T-lymphotropic virus type I (HTLV-I) でトランスホームすることによって株化されたTリンパ芽球様細胞であるTCL-Fuj細胞, TCL-Tan細胞, TCL-Kan細胞, TCL-Haz細胞(66,67), TCL-Fuj細胞から派生したTCL-Fuj2M細胞, TCL-FujH1細胞, TCL-FujH2細胞, TCL-FujL1細胞(149), ヒト前骨髄球様白血病細胞株であるHL60細胞(150), ヒト羊膜由来のFL細胞, ヒト鼻咽腔癌由来のKB細胞などを用いた。メチル化パターンの解析に先立って、これらの株化培養細胞のIFN- γ 遺伝子の周辺で染色体転座やウイルスゲノム挿入などのDNA 組み換えが生じていないかどうかをSouthern ハイブリダイゼーションによって調べた。*EcoRI*, *HindIII*, *PvuII*, *MspI*などで切断したDNA のSouthern ハイブリダイゼーションパターンは、上記の全ての細胞株で一致しており、またこれはクローン化IFN- γ 遺伝子の制限酵素地図(図14 Aおよび文献78)とも矛盾しないパターンであった。従って、どの細胞株においても、IFN- γ 遺伝子近傍の少なくとも数千塩基対以内では大きなDNA 組み換えは起きていないと思われる。

ここで用いたTリンパ芽球様細胞のIFN- γ 産生能を表11に示した。このうち、TCL-FujH1, TCL-FujH2, TCL-FujL1の3株は、TCL-Fuj細胞あるいはTCL-Fuj2M細胞を限定希釈法によってクローン化したクローン細胞株である(149)。TCL-Fuj細胞

表11. 種々のTリンパ球細胞株におけるIFN 産生量

細胞	インターフェロン力価 (IU/ml)
TCL-Fuj	5,400
TCL-Fuj H1	4,600
TCL-Fuj H2	1,200
TCL-Fuj 2M	490
TCL-Fuj L1	1,500
TCL-Tan	4
TCL-Haz	30
TCL-Kan	< 3

10 % FCS を含むRPMI-1640 培地に 1×10^6 cells/ml の濃度で細胞を撒き、37 °Cで3日間培養した後、培養上清中のIFN 活性を測定した。

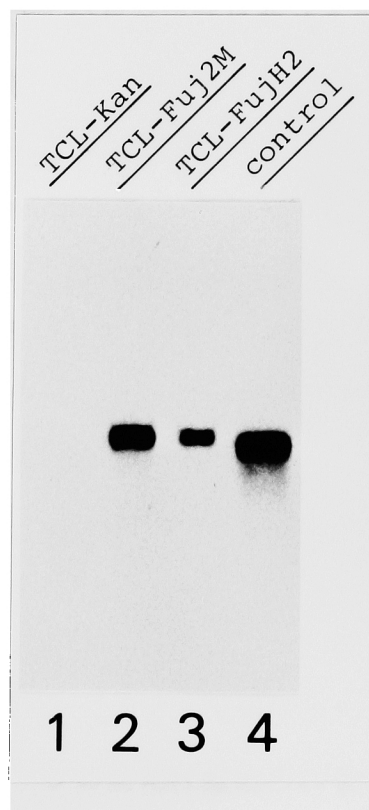


図15. Tリンパ芽球様の株化培養細胞におけるIFN- γ mRNA の発現量

TCL-Kan 細胞 (レーン 1) , TCL-Fuj2M 細胞 (レーン 2) , TCL-Fuj2H 細胞 (レーン 3) から抽出した全細胞RNA (各 30 μ g) および「結果」-2 の部分精製ヒトIFN- γ mRNA (レーン 4 , 0.3 μ g) を用いてアガロースゲル電気泳動を行い、 32 Pで標識したIFN- γ cDNA をプローブとしてNorthern ハイブリダイゼーションを行った。

胞と TCL-FujH1 細胞は高単位の IFN- γ を構成的に分泌する細胞である。他方、TCL-Fuj2M, TCL-FujH2, TCL-FujL1 などの細胞では構成的に産生される IFN- γ の力価は低い。これらの細胞を Con A と TPA で刺激すると TCL-Fuj 細胞に匹敵するほどの IFN- γ が誘導される (67,149)。また、TCL-Tan 細胞と TCL-Haz 細胞は微量の IFN- γ を産生しているが、TCL-Kan 細胞は全く産生しない。TCL-Kan 細胞では IFN- γ mRNA も全く検出されなかった (図 15)。

図 16 は、TCL-Fuj 細胞とその派生株におけるメチル化パターンを調べたものである。TCL-Fuj 細胞では、その IFN- γ 遺伝子の M 1 および M 2 部位におけるメチル化の程度はかなり低く、M 3, M 4 部位がメチル化されていない DNA も検出された (図 16 A, B; レーン 1)。TCL-FujH1 細胞, TCL-Fuj2M 細胞, TCL-FujL1 細胞も、M 1, M 2, M 3 部位のメチル化の程度は親株の TCL-Fuj 細胞とほぼ同じであった。しかし、M 4 部位のメチル化の程度は、TCL-FujH1 細胞では親株より低く、逆に、TCL-Fuj2M 細胞と TCL-FujL1 細胞では親株より高かった (レーン 2,4,5)。また、TCL-FujH2 細胞は、どの CCGG 配列も他の TCL-Fuj 系の細胞よりメチル化の程度が高かった (レーン 3)。これら TCL-Fuj 系の細胞の IFN- γ 遺伝子近傍において複数の CCGG 配列が同時に非メチル化されているかどうかは、HpaII 単独消化によって見積もった (図 16 B)。M 1 と M 3 部位が同時に非メチル化されていることで生じる 5.6 kb のバンドは TCL-Fuj 系の細胞全てに共通に見出されたが、M2/M3 部位の非メチル化によって生じる 4.0 kb のバンドは IFN- γ 産生能の高い TCL-Fuj 細胞と TCL-FujH1 細胞でのみ顕著に観察された。また、TCL-Fuj2M, TCL-FujH2, TCL-FujL1 細胞では 50 kb 以上の分子サイズを有するバンドが非常に多いことから、大部分の DNA では IFN- γ 遺伝子近傍が高度にメチル化されていることがわかった (図 16 B, レーン 2, 3, 5)。これに対し、TCL-Fuj細胞では 50 kb 以上のバンドはかなり少なく、TCL-FujH1 細胞ではほとんど検出されなかった (レーン 1, 2)。従って、TCL-Fuj 細胞と TCL-FujH1 細胞の IFN- γ 遺伝子領域では TCL-FujH2, 2M, L1 細胞に比べてメチル化の程度がさらに低いといえる。TCL-Fuj2M 細胞を Con A と TPA で刺激すると IFN- γ 産生が上昇する (67,149)が、その際メチル化パターンの変化は認められなかった (データは省略する)。

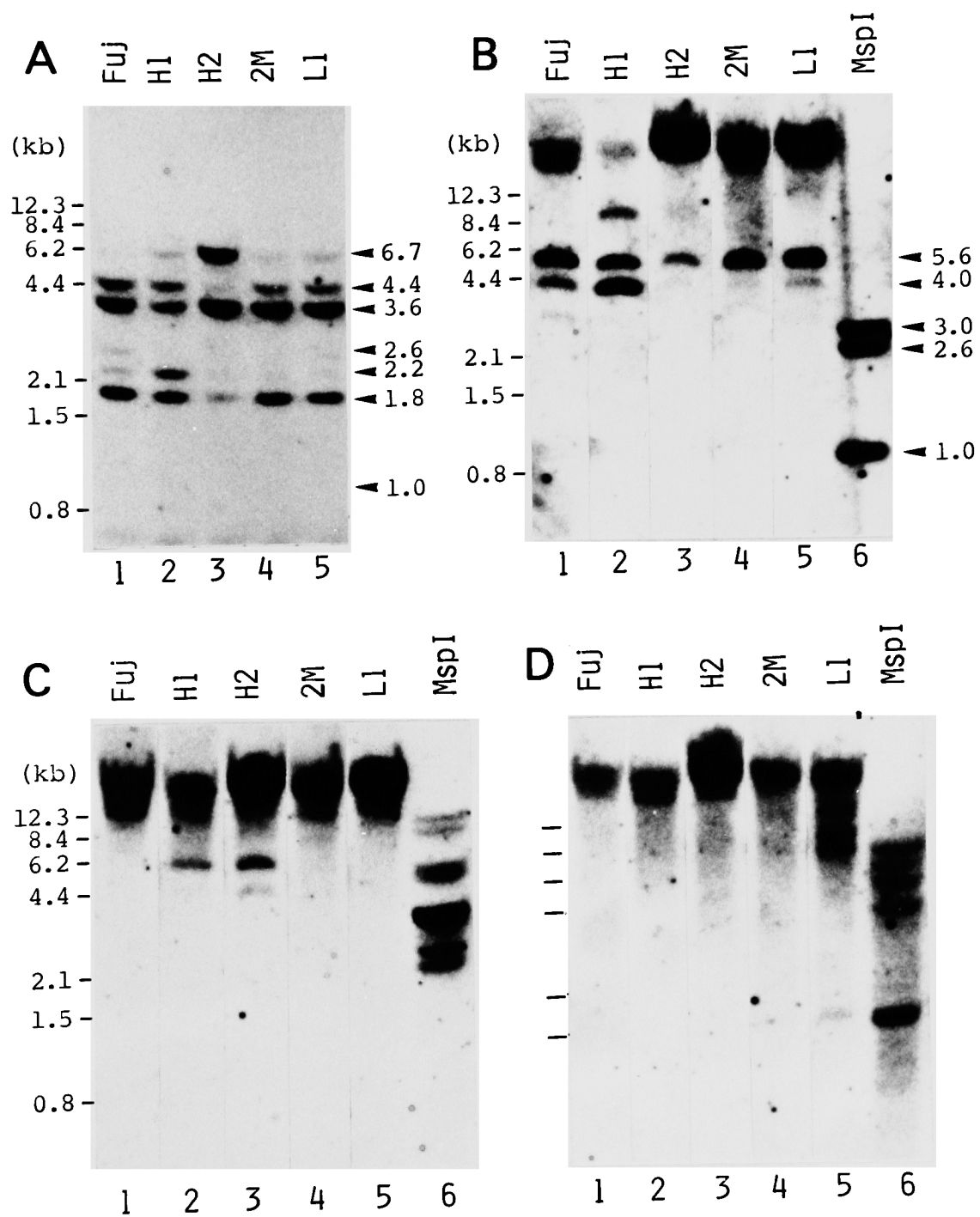


図16. TCL-Fuj 細胞とその派生株における IFN- γ 遺伝子のメチル化パターン
*Hpa*IIと*Pvu*II で二重消化したDNA (パネル A), *Hpa*II で単独消化したDNA (パネル B, C, D のレーン 1 ~ 5), *Msp*I で消化したDNA (パネル B, C, D のレーン 6) を用いて Southern ハイブリダイゼーションを行った。プローブには、IFN- γ cDNA (パネル A と B), IFN- α 1 cDNA (パネル C), γ -グロビン cDNA (パネル D) を用いた。DNA を抽出した細胞は、各パネルとも、TCL-Fuj (レーン 1), TCL-FujH1 (レーン 2), TCL-FujH2 (レーン 3), TCL-Fuj2M (レーン 4), TCL-FujL1 (レーン 5, 6) である。

IFN- γ 産生量の低いリンパ球系培養細胞のメチル化パターンを同様に解析したのが図 17 である。TCL-Tan 細胞, TCL-Haz 細胞, TCL-Kan 細胞の IFN- γ 遺伝子は、4 つの CCGG 配列全てにおいてほぼ完全にメチル化されていた (図 17 A, B; レーン 1, 2, 3)。他方、IFN- γ を産生しない前骨髄球様白血病細胞である HL60 細胞では、M 3, M 4 部位はメチル化されていたが、M 1 部位と M 2 部位のメチル化は部分的であった (図 17 A, レーン 4; 4.9 kb, 4.4 kb, 1.8 kb のバンド)。しかし、HL60 細胞 DNA の *Hpa*II 単独消化で 2.6 kb のバンドが検出されないことから、M 1, M 2 部位が同時に非メチル化されている細胞はほとんどないことがわかった。これらの結果は、リンパ球系細胞では IFN- γ 遺伝子領域全体のメチル化の程度と IFN- γ 産生量に逆相関性があることを示唆している。

TCL-Fuj 細胞や TCL-FujH1 細胞で顕著に認められた低メチル化状態が IFN- γ 遺伝子に特異的であるかどうかを見るために、IFN- α 遺伝子と γ -グロビン遺伝子のメチル化パターンを調べた (図 16, 17; C, D)。IFN- α 遺伝子は TCL-FujH1 およ

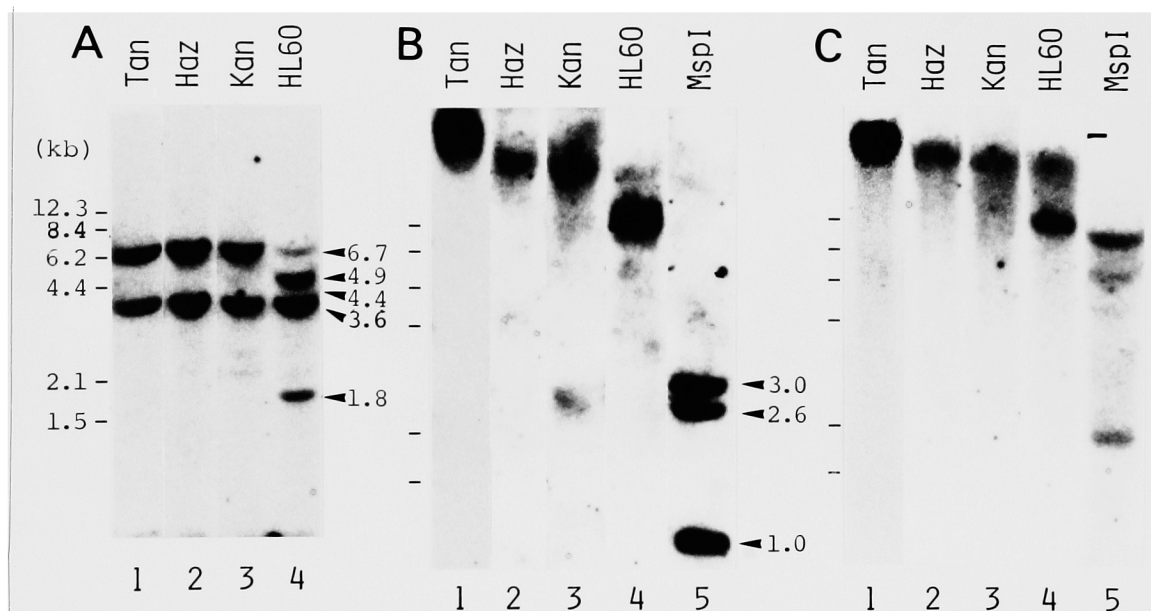


図 17. IFN- γ 産生量の低いリンパ球様株化培養細胞における IFN- γ 遺伝子のメチル化パターン

*Hpa*II と *Pvu*II で二重消化した DNA (パネル A), *Hpa*II で単独消化した DNA (パネル B, C のレーン 1 ~ 4), *Msp*I で消化した DNA (パネル B, C のレーン 5) を用いて Southern ハイブリダイゼーションを行った。プローブには、IFN- γ cDNA (パネル A と B), γ -グロビン cDNA (パネル C) を用いた。DNA を抽出した細胞は、TCL-Tan (レーン 1), TCL-Haz (レーン 2), TCL-Kan (レーン 3, 5), HL60 (レーン 4) である。

びH2細胞で、また、 γ -グロビン遺伝子はTCL-FuJL1細胞とHL60細胞で僅かに非メチル化状態にあることが示されたが、その他の細胞では高度にメチル化されていた。従って、IFN- γ 、IFN- α 、 γ -グロビンの各遺伝子間でメチル化状態の相関性はないと考えられる。

15. 上皮系株化培養細胞におけるIFN- γ 、 γ -グロビン両遺伝子の低メチル化

図18は、上皮系培養細胞であるKB細胞とFL細胞におけるIFN- γ 、IFN- α 、 γ -グロビン遺伝子のメチル化状態を調べたものである。KB細胞では、IFN- α 遺伝子は高度にメチル化されていたが、IFN- γ 遺伝子と γ -グロビン遺伝子のCCGG配列は意外にも全くメチル化されていなかった。FL細胞でも、IFN- γ 遺伝子のM2、M3部位が僅かにメチル化されている以外は、KB細胞とほぼ同様の結果であった（図18A、レーン3；6.6 kbバンド）。これらの上皮系細胞はIFN- γ を産生しないことから、この遺伝子の4つのCCGG配列が非メチル化状態にあるだけでは遺伝子は発現されないことが示された。

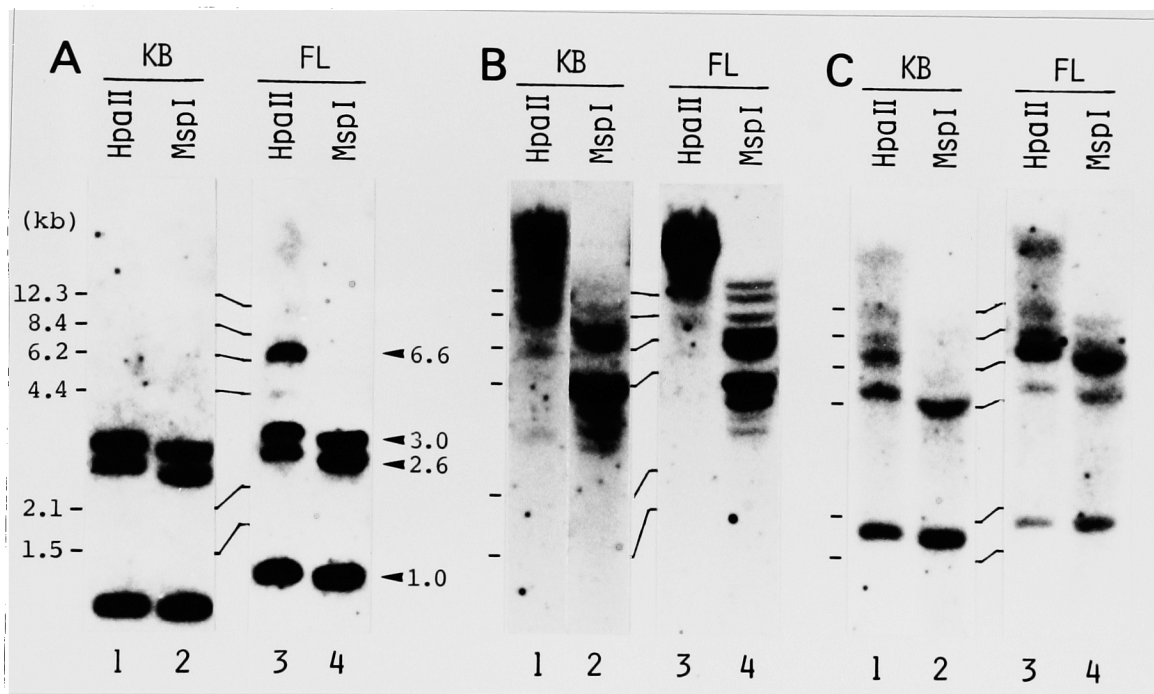


図18. 上皮系株化培養細胞におけるIFN- γ 遺伝子のメチル化パターン
KB細胞（レーン1，2）あるいはFL細胞（レーン3，4）から抽出したDNAを、*Hpa*II（レーン1，3）あるいは*Msp*I（レーン2，4）で消化し、 32 Pで標識したIFN- γ cDNA（パネルA）、IFN- α 1 cDNA（パネルB）、 γ -グロビン cDNA（パネルC）をプローブに用いてSouthernハイブリダイゼーションを行った。

考 察

1、ヒトインターフェロン- γ の構造

筆者らが得たヒト IFN- γ cDNA の塩基配列は少なくともコード領域においては Davos ら (76) のそれと完全に一致しており、従ってそこから推定されるアミノ酸配列も同じである。この cDNA は 166 個のアミノ酸残基からなる IFN- γ 前駆体ポリペプチド鎖をコードしている。Gray らは、当初、IFN- γ 前駆体の最初の 20 個のアミノ酸配列がシグナルペプチドであり、成熟 IFN- γ 分子は 146 個のアミノ酸配列から成ると推定した (74)。これはヒト IFN- α 2 のシグナルペプチドとの相同性などに基づいた推定であったが、その後、天然ヒト IFN- γ の NH₂-末端はピログルタミン酸残基であることが示された (72)。従って、はじめのメチオニンから 23 番目のシステインまでがシグナルペプチドであり、成熟 IFN- γ タンパク質のポリペプチド鎖は 143 アミノ酸残基から成ると考えられる。これに基づいて前駆体および成熟 IFN- γ のポリペプチド部分の分子量を計算した値は、それぞれ 19,350, 16,780 となる。また、アスパラギン結合型糖鎖が結合し得る配列 (Asn-X-Ser or Thr) は、25~27 番 (Asn-Gly-Thr), 97~99 番 (Asn-Tyr-Ser) の 2 か所に存在する。ヒト IFN- γ cDNA としては、図 8 で示した配列の他に、137 番目のアルギニン (CGA) がグルタミン (CAA) に置き代わった cDNA (74) や 6 番目のリジン (AAA) がグルタミン (CAA) に置き代わった cDNA (77) が単離されており、いずれも活性を有する IFN- γ 分子をコードすることが確認されている。ヒト IFN- γ の染色体遺伝子はハプロイドあたり一個しか見出されない (78) ことから、これら 3 つの cDNA は同一遺伝子座における対立遺伝子によるものであると考えられる。

2、マウス細胞によるヒトインターフェロンの生産

本研究では、SV40 プロモーターの下流にヒト IFN- γ cDNA あるいは IFN- α 5 DNA を接続したハイブリッド遺伝子をウシパピローマウイルス (BPV) ベクターを用いてマウス C127 細胞に導入し、ヒト IFN の発現を試みた。これは、コピー数の高い BPV ベクターによる遺伝子量効果 (gene dosage effect) と SV40 エンハンサー-プ

ロモーターの高い転写活性を組み合わせることによって、ヒト IFN をコードする mRNA の生産量、ひいては IFN タンパク質の生産量を高めることを意図した。

組み換え BPV (pFN γ , pFN α 5) による C127 細胞のトランスホメーション効率は完全な BPV-DNA に比べて低かったが、得られた形質転換株は全てヒト IFN を発現していた。F γ 56 細胞では、培養上清中の IFN- γ 力価は約 3×10^5 IU/ml に達した。これは、ヒト脾細胞をマイトゲンで刺激して得られる産生量 (図 4) の十数倍もの値である。また、F α 28 細胞の IFN- α 5 産生量も約 4×10^5 IU/ml であり、白血球やリンパ芽球細胞 (Namalwa 細胞) で得られる生産量の数倍の値であった (3, 27~29)。

動物細胞で IFN- γ を発現させる目的の一つは、糖鎖を有した IFN- γ 分子を生産することであった。その場合に、天然ヒト IFN- γ に見出されるような糖鎖の数による多型性 (25 K = 糖鎖 2 本, 20 K = 糖鎖 1 本, 15 K = おそらく糖鎖なし) が現れるかどうか、また、マウス細胞で生産したヒト IFN- γ が、天然のものと同じ NH₂-末端ブロック構造をとっているのか否かを調べるために、F γ 56 細胞由来 IFN- γ の精製を行った。F γ 56 細胞で生産した組み換えヒト IFN- γ は Con A-Sepharose カラムあるいは抗 IFN- γ モノクローン抗体カラムを用いた比較的簡便な方法によって高度に精製することができた。Con A-Sepharose カラムに特異的に結合することは、この組み換え IFN- γ が糖鎖構造を有していることを示している。この精製標品の SDS-電気泳動における相対分子量がおよそ 24~26 K であることから、これは、2 か所に糖鎖が付加した天然ヒト IFN- γ (25 K 分子種) (72) に対応するものであると思われる。調製標品によっては約 20 K の分子種も認められるとのことである (190) が、これはおそらく糖鎖が一か所にだけ付加した分子であろう。糖鎖のない IFN- γ 分子と思われるようなバンドは特に検出されなかった。Haynes と Weissmann は、ハムスター細胞 (CHO 細胞) で生産したヒト IFN- γ の相対分子量を 22,400~23,400 と報告している (93) が、Scahill らは同じく CHO 細胞で生産したヒト IFN- γ を解析し、相対分子量約 25,000, 21,000 の 2 成分が主成分であり、また、わずかながら分子量 17,000 の分子も存在すると述べている (94)。糖タンパクの糖鎖構造には一般に微細な多型性があり、SDS-電気泳動の条件によってバンドの

太さや相対移動度がかなり変化することが知られているので、二つの研究グループの食い違いの原因はそのようなことかもしれない。いずれにせよ、マウス細胞やハムスター細胞で生産したヒト IFN- γ も糖鎖部分を有しており、分子量における多型性も天然の IFN- γ とよく似た性状をとっている。また、マウス C127 細胞由来ヒト IFN- γ のゲルクロマトグラフィーにおける分子量は約 58,000 の値を示し、天然 IFN- γ (183) 同様、ネイティブな状態では二量体として存在していることも示された。Mutsaers らは、CHO 細胞で生産した組み換えヒト IFN- γ の糖鎖の構造を解析し、Man, Gal, GlcNAc, NeuAc, Fuc などの単糖をおよそ 3.8 : 2.0 : 3.5 : 0.6 : 0.4 のモル比で含むアスパラギン結合性 N-アセチルラクトサミン型糖鎖であることを示した(191)。このような糖鎖構造はヒト絨毛性性腺刺激ホルモン (chorionic gonadotropin) などで見出されており(192,193)、天然ヒト IFN- γ の糖鎖と同様の構造をとっていることが示唆された。マウス細胞由来組み換えヒト IFN- γ の糖鎖も同じような構造をとっている可能性は十分に考えられる。

Rinderknecht らは、天然ヒト IFN- γ は NH₂-末端のグルタミン残基の環化(ラクタム化)によってブロックされていることを示した(72)。本研究においてマウス細胞で生産した組み換えヒト IFN- γ も NH₂-末端がブロックされており、精製標品をそのままエドマン分解に供した場合には有意な遊離アミノ酸は検出されなかった。また、精製標品のトリプシン消化ペプチドには <Glu-Asp-Pro-Tyr-Val-Lys> の配列をもったペプチドが存在しており、天然の IFN- γ と同じ NH₂-末端構造をとっていること、すなわち、前駆体タンパク質の最初のメチオニンから 23 番目のシステインまでの部分が分泌の際に切除されることがわかった。

マウス細胞由来の組み換えヒト IFN- γ の高度精製標品の比活性は $7.1 \sim 7.9 \times 10^7$ IU/mg タンパク質であった。この値は、報告されている天然ヒト IFN- γ の比活性 ($4 \sim 12 \times 10^7$ IU/mg (73), 28×10^7 IU/mg (194)) や、CHO 細胞由来ヒト IFN- γ の比活性 ($10 \sim 16 \times 10^7$ IU/mg (195,196)) と比較して大きく異なるものではないと考えられる。また、この組み換え IFN- γ は、種特異性や抗原性といった生物学的性質に関しても天然のそれと区別できなかった。

マウス細胞で生産したヒト IFN- α 5 は SDS-電気泳動において相対分子量 19,000 \pm

500 の単一のバンドを与えた。ヒト IFN- α 5 の推定アミノ酸配列中にはアスパラギン結合型糖鎖が付加し得る配列は見出されない(44)ことから、IFN- α 5 も多くのヒト IFN- α と同じく糖鎖を有していないと考えられる。上記の分子量は成熟 IFN- α 5 のアミノ酸配列からの計算値(19,550, 文献93)とよく一致しており、シグナルペプチドが正しく切断されたことを示唆している。

意外なことに、マウス細胞で生産した組み換えヒト IFN- α 5 と大腸菌で生産したヒト IFN- α 5 は、種特異性に関して異なる性状を示した。すなわち、F α 28 細胞や F α 6 細胞で生産したヒト IFN- α 5 はマウス L 細胞に対しても国際単位比で 0.3~0.5 % 程度の抗ウイルス活性を示すのに対し、大腸菌で生産したヒト IFN- α 5 では全く交叉活性が検出されなかった(表7)。IFN- β や γ に比べると IFN- α の種特異性は低く、ヒト IFN- α サブタイプの少なくともいくつかはマウス細胞にも作用することが知られている(197,198)。天然のヒト IFN- α は多種類の混合物であるため、天然ヒト IFN- α 5 サブタイプがマウス細胞に対する交叉活性を有しているかどうかは不明である。Tsukui らは、天然ヒト IFN- α を抗原として調製したモノクローン抗体(HT-1 抗体)はマウス細胞由来の組み換えヒト IFN- α 5 を中和、沈降するのに対し、大腸菌由来組み換え IFN- α 5 とは反応しないこと、また逆に、大腸菌由来組み換えヒト IFN- α 2 を抗原として調製したモノクローン抗体(104-5-f 抗体)は大腸菌由来組み換えヒト IFN- α 5 を中和、沈降するのに対し、マウス細胞由来のヒト IFN- α 5 とは反応しないことを示した(188)。この結果は、同じヒト IFN- α 5 でありながら、マウス細胞由来のものと大腸菌由来のものとは異なるエピトープを有していることを示している。マウス細胞に対する交叉活性に差が生じたのも、由来の異なる 2 つの IFN- α 5 の分子構造の違いに起因するのであろう。2 つの IFN- α 5 標品の遺伝子とはもともと Brack ら(50)によってクローン化されたものなので、これらのタンパク質は本来同じアミノ酸配列を持っているはずであるが、いずれかの遺伝子が突然変異を起こしている可能性を否定することはできない。しかし、筆者は、翻訳後修飾の有無によって NH₂-、COOH-末端部のアミノ酸配列や修飾アミノ酸残基に違いが生じているのではないかと考えている。あるいは、タンパク合成の「場」の違い(膜結合型リボソーム上か?、あるいは遊離型リボソーム上か?)

によって、コンホメーションに違いが生じる場合もあるかもしれない。IFN- β やIFN- γ でも、大腸菌由来のものと天然のものとで抗原性が異なる例が報告されている(91,92)。

本研究の目的は、マウスC127細胞とBPVの宿主-ベクター系を用いてIFN遺伝子を発現させ、天然のものと同様の構造を持ったヒトIFN- γ やIFN- α 5を大量に生産することであった。生産量に関しては大腸菌での方法(84~87)には及ばないが、前駆体タンパクのシグナルペプチドの正確な位置での切断や糖鎖の付加が可能となる意義は大きい。また、大腸菌では成熟IFNを菌体内に蓄積させる生産法がとられているためか、COOH-末端側の欠けたIFNができる例が知られている(90)。筆者らの用いたマウス細胞の系では、IFNが培地中へ分泌されるので、細胞内プロテアーゼによって分解される可能性は低いことが期待できる。さらに、低血清培地や無血清培地でもかなりの生産量が維持されることは、組み換えIFNの精製に有利な点である。

最近、Maedaらは、カイコ(*bombyx mori*)の核多角体ウイルス(nuclear polyhedrosis virus)をベクターとしてヒトIFN- α Jをカイコの培養細胞および個体(幼虫)で発現させ、非常に高い生産量が得られることを示した(199)。IFN- β やIFN- γ をカイコ細胞で発現させることも当然可能であろう。しかし、カイコの細胞でも糖鎖は付加されるものの、その構造は哺乳類のものとは異なっている可能性がある(200)。糖鎖構造の点では、哺乳類細胞(できればヒト細胞)を用いることが望ましいといえるだろう。哺乳類培養細胞を用いた組み換えヒトIFN生産系としては、本研究のマウスC127細胞-BPV系(105)と、HaynesとWeissmann(93)およびScahillら(94)によって報告されたCHO細胞-遺伝子増幅系の2つの方法が生産量や細胞の安定性の点で優れていると考えられる。

3、IFN- γ 遺伝子発現におけるDNAメチル化機構の意義

種々のヒト正常細胞および株化培養細胞におけるIFN- γ 遺伝子近傍の各CCGG配列でのメチル化の程度を図19にまとめた。

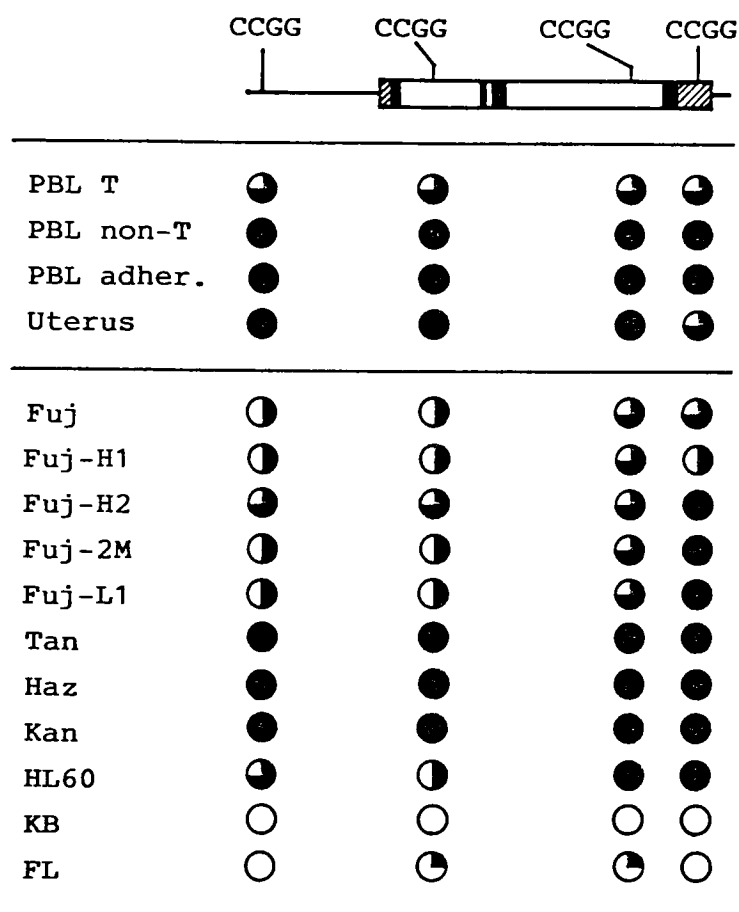


図 19. 種々のヒト正常細胞および株化培養細胞の IFN- γ 遺伝子近傍の CCGG 部位における DNA メチル化レベル

IFN- γ 遺伝子の DNA メチル化レベルは、HpaII-PvuII 二重消化 DNA の Southern ハイブリダイゼーションにおけるバンドの強さ（図 14 と図 16～18）を比較することによって見積もった。●，ほぼ完全にメチル化；● 70 % 以上メチル化；○ 30～70 % メチル化；○ 30 % 以下メチル化；○ ほぼ完全に非メチル化

ヒト末梢血から分画したリンパ球で調べた結果、T 細胞画分から得た DNA では IFN- γ 遺伝子領域の 4 つの CCGG 配列の全ての部位において非メチル化シトシン残基が検出された。M 1 から M 4 までのいずれの CCGG 配列でも、非メチル化状態にある DNA の割合は低かったが、それらの非メチル化シトシンは別々の細胞でランダムに生じているのではなく、T 細胞画分中の一部の細胞集団において複数の部位（M 1 部位と M 3 部位，M 2 と M 4，M 2 と M 3）が共に非メチル化の状態にあることが示された。すなわち、T 細胞画分の大部分の細胞やその他のリンパ球画分（非

T細胞、プラスチック付着性細胞)のIFN- γ 遺伝子は高度にメチル化されているのに対し、T細胞画分のごく一部の細胞集団ではIFN- γ 遺伝子領域全体に渡って低メチル化状態にあることが見出された。子宮組織のDNAでは、一つのCCGG配列(M4部位)の部分的な非メチル化が検出されたが、他のCCGG配列はIFN- γ 遺伝子近傍の数キロ塩基対に渡って高度にメチル化されており、T細胞画分で認められたようなIFN- γ 遺伝子領域全体に渡る低メチル化状態ではなかった。同時に調べたIFN- α 遺伝子や γ -グロビン遺伝子の近傍のCCGG配列はいずれのリンパ球画分でもほぼ完全にメチル化されていることから、Tリンパ球のDNAが特に脱メチル化されやすいような傾向を持っているとは考えられない。従って、T細胞で見出された低メチル化状態はIFN- γ 遺伝子(およびその他の限られた数の遺伝子)に特異的に生じているものであろう。

IFN- γ は感作抗原やT細胞マイトゲンで刺激されたTリンパ球によって産生されるリンホカインであるが、全てのTリンパ球がIFN- γ を産生するのではなく、ある特定の細胞(T細胞サブセット)のみがIFN- γ を発現、分泌していると考えられる。そのサブセットの種類に関してはいろいろな報告があるが(201~206)、それらは必ずしも一致しておらず未だ明確な同定はなされていない。本研究で見出された低メチル化IFN- γ 遺伝子を有する細胞は、IFN- γ を産生するT細胞サブセットに他ならないであろう。すなわち、IFN- γ を産生しない細胞ではIFN- γ 遺伝子はメチル化されており、IFN- γ を産生するべく分化したT細胞サブセットではIFN- γ 遺伝子の低メチル化が起きていると考えられる。

さらに、IFN- γ 産生能の異なる株化培養細胞を用いた結果から、IFN- γ 遺伝子のDNAメチル化に関していくつかの知見が得られた。IFN- γ を構成的に発現しているTCL-FuJ細胞とそれに由来する派生株では、Tリンパ球と同様、IFN- γ 遺伝子領域の低メチル化状態が観察されたが、その程度は細胞株ごとに異なっていた。IFN- γ 産生能が特に高いTCL-FuJ細胞とTCL-FuJH1細胞では全てのCCGG配列においてメチル化の程度が低く、しかも複数の部位が同時に非メチル化(M1/M3, M2/M3)していた。この非メチル化パターンは正常Tリンパ球で見出されたパターンと非常によく似ていた。一方、これよりIFN- γ 産生能の低いTCL-FuJH2, TCL-FuJ2M, TCL-

FuJL1 などの細胞では比較的メチル化の程度が高く、複数の部位が同時に非メチル化している程度も低かった。また、IFN- γ 産生能が極めて低い TCL-Tan, TCL-Haz, TCL-Kan などの細胞ではいずれの CCGG 配列もほぼ完全にメチル化されていた。従って、本研究で調べた T リンパ芽球様細胞では、IFN- γ 遺伝子の発現効率は遺伝子のメチル化の程度と逆相関の関係にあることがわかった。この結果は、他の多くの遺伝子で示されているのと同様、DNA メチル化が IFN- γ 遺伝子の転写に対して抑制的に作用することを示唆している。しかし、上皮系培養細胞である KB 細胞や FL 細胞は IFN- γ 遺伝子の 4 つの CCGG 配列はほとんどメチル化されていないにもかかわらず IFN- γ を全く産生しないことから、遺伝子が低メチル化状態にあるからといって IFN- γ 遺伝子が発現するとは限らないことが示された。すなわち、低メチル化状態は IFN- γ 遺伝子が発現するための必要条件であって十分条件ではないと考えられる。IFN- γ 遺伝子が発現するためには他の要因としては、例えばクロマチン構造の変化や特異的転写制御因子の存在が挙げられよう。

しかし、これとは別に、低メチル化状態は単に遺伝子が転写された結果として引き起こされた状態である可能性も考えられる。ニワトリヴィテロジェニン遺伝子はホルモン刺激によって活性化されるが、それよりやや遅れて遺伝子の低メチル化状態が観察されるようになるという(117,118)。また、受精卵にレトロウイルス DNA を導入した実験では、ウイルス mRNA の転写が抑制された後に遺伝子が *de novo* にメチル化されるとの報告がある(207,208)。これらの結果は、メチル化パターンの変化が遺伝子活性を制御しているのではなく、逆に、遺伝子の転写によってその遺伝子のメチル化状態の維持あるいは *de novo* メチル化が阻害されていることを示唆している。IFN- γ 遺伝子の場合にも転写の結果として低メチル化状態が引き起こされた可能性を否定することはできない。しかし、KB 細胞や FL 細胞では IFN- γ 遺伝子は転写されていないにもかかわらずメチル化されてはおらず、転写の有無が一義的にメチル化状態を決定しているわけではない。

KB 細胞や FL 細胞で IFN- γ 遺伝子の CCGG 配列がほぼ完全に脱メチル化していたのは意外であった。がん細胞や株化培養細胞ではいろいろな遺伝子が低メチル化状態になることが知られており(209,210)、これらの上皮系細胞や HL60 細胞で非

メチル化部位が見出されたのも同様の現象を見ているのであろう。また、TCL-FuJH1, H2, L1 細胞はクローン化された細胞株であるため均一なメチル化パターンを示すであろうと期待したにもかかわらず、IFN- γ , IFN- α , γ -グロビンなどのいずれの遺伝子でも、あるCCGG 配列におけるメチル化の程度は” All or Nothing ”ではなく部分的であった。これらのクローン化細胞株におけるDNA メチル化パターンの不均一性は、ゲノムの異数性 (heteroploidy) の反映ではなく、メチル化状態の不安定性 (210,211)によるものと考えられる。ゲノムの異数性に起因するに
しては、メチル化／非メチル化の割合が高過ぎるからである (図 16, レーン 2, 3, 5)。

最近、Farrar らは、IFN- γ 産生能が低下したマウス T リンパ球細胞株を 5-アザシチジンで処理すると IFN- γ 産生能が回復することを見出したが、その際 IFN- γ 遺伝子近傍の CCGG 配列の脱メチル化は認められなかったという (212)。しかし彼らも述べているように、5-アザシチジン処理で CCGG 配列以外の CG 部位が脱メチル化されることによって IFN- γ 遺伝子が活性化された可能性も考えられる。筆者らが観察しているのも IFN- γ 遺伝子近傍に 30 箇所以上存在する CG 配列 (78)の一部に過ぎない点は考慮しておかねばならない。IFN- γ 遺伝子の発現における DNA メチル化の役割を明確にするためには、クローン化した IFN- γ 遺伝子 DNA を *in vitro* でメチル化し、その転写活性を解析する必要があるだろう。

謝 辞

本研究を進めるにあたり、終始熱心な御指導、御鞭撻を賜りました京都大学ウイルス研究所の川出由己教授、宗川吉汪助教授、東京大学医科学研究所の上代淑人教授、長田重一博士、兵庫医科大学の岡村春樹博士、長田久美子博士、の諸先生方に心から感謝の意を表します。また、組み換えヒトIFN- γ の精製に際して有益な御助言を頂きました京都大学ウイルス研究所の山本洋子博士ならびに宮田敬三氏（現在 石原産業会社中央研究所）、組み換えヒトIFN- γ のアミノ酸組成とNH₂-末端アミノ酸配列の決定に御協力頂きましたサントリー生物医学研究所の久保田一郎博士、IFN- γ 遺伝子のメチル化パターンの解析に御協力頂きました神戸市環境保健研究所の松山雅子博士に感謝致します。あわせて、常に熱心な討論を行って下さいました京都大学ウイルス研究所の富山朔二助教授、東雄二郎博士（現在 癌研究会癌研究所）、いつも暖かい励ましの言葉を下さいました京都大学ウイルス研究所細胞ウイルス部門ならびに東京大学医科学研究所化学部門の皆さんに厚く御礼を申し上げます。

引用文献

1. Nagano, Y., and Kojima, Y. (1954) *Compt. Rend. Soc. Biol.* 148, 1700-1702
2. Isaacs, A., and Lindenmann, J. (1957) *Proc. Roy. Soc. Ser. B* 147, 258-267
3. Stewart II, W. E. (1979) *The Interferon System* (Springer, New York)
4. 小林茂保／編 (1985) インターフェロンの科学 (講談社)
5. 川出由己, 桑田次男, 小林茂保／編 (1981) 蛋白質 核酸 酵素 別冊 NO.25 「インターフェロン研究の進歩」
6. Gresser, I., Bandu, M. T., Brouty-Boye, D., and Tovey, M. G. (1974) *Nature* 251, 543-545
7. Paucker, K., Cantell, K., and Henle, W. (1962) *Virology* 17, 324-334
8. Braun, W., and Levy, M. B. (1972) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 141, 769-773
9. Gisler, R. M., Lindahl, P., and Gresser, I. (1974) *J. Immunol.* 113, 438-444
10. Nathan, C. F., Murray, H. W., Wiebe, M. E., and Rubin, B. Y. (1983) *J. Exp. Med.* 158, 670-689
11. Le, J., Prenskey, W., Yip, Y. K., Chang, Z., Hoffman, T., Stevenson, H. C., Balazs, I., Sadlik, J. R., and Vilcek, J. (1983) *J. Immunol.* 131, 2821-2826
12. Trinchieri, G., and Santoli, D. (1978) *J. Exp. Med.* 147, 1314-1333
13. Fllous, M., Nir, U., Wallach, D., Merlin, G., Rubinstein, M., and Revel, M. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79, 3082-3086
14. Basham, T. Y., Bourgeade, M. F., Creasey, A. A., and Merigan, T. C. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79, 3265-3269
15. Yoshie, O., Schmidt, H., Reddy, E. S. P., Weissman, S., and Lengyel, P. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 13169-13172
16. Atanasiu, P., and Chany, C. (1960) *Compt. Rend. Acad. Sci.* 251, 1687-1689
17. Gresser, I. (1972) *Adv. Cancer Res.* 16, 97-140
18. Gresser, I., and Tovey, M. G. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 516, 231-247
19. Kerr, I. M., and Brown, R. E. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75, 256-260
20. Roberts, W. K., Hovanessian, A., Brown, R. E., Clemens, M. J., and Kerr, I. M. (1976) *Nature* 264, 477-480
21. Schmidt, A., Zilberstein, A., Shulman, L., Federman, P., Berissi, H., and Revel, M. (1978) *FEBS Letters* 95,

257-264

22. Revel, M. (1979) Interferon 1979 (Gresser, I. ed.) p.102, Academic Press, New York
23. 宗川吉汪 (1984) 遺伝 38, 89-97
24. Stewart II, W. E., Blalock, J. E., Burke, D.C., Chany, C., Dunnick, J. K., Falcoff, E., Friedman, R. M., Galasso, G. H., Jolik, W.K., Vilcek, J. T., Younger, J. S., and Zoon, K. C. (1979) Nature 286, 110
25. Rubinstein, M., Rubinstein, S., Familletti, F., Miller, R., Waldman, A., and Pestka, S. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76, 640-644
26. Berg, K., and Heron, L. (1980) Scand.J. Immunol. 11, 489-502
27. Zoon, K. C., Smith, M. E., Bridgen, P. J., Nedden, D., and Anfinson, C. E. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76, 5601-5605
28. Yonehara, S., Yanase, Y., Sano, T., Imai, M., Nakasawa, S., and Mori, H. (1981) J. Biol. Chem. 256, 3770-3775
29. Allen, G., and Fantes, K. H. (1980) Nature 287, 408-411
30. Knight, E., Jr., Humkapiller, M. W., Korat, B. D., Hardy, R. W. F., and Hood, L. E. (1980) Science 207, 525-526
31. Tan, Y. H., Barakat, F., Berthold, W., Smith-Johannsen, H., and Tan, C. (1979) J. Biol. Chem. 254, 8067-8073
32. Nagata, S., Taira, H., Hall, A., Johnsrud, L., Streuli, M., Ecsödi, J., Boll, W., Cantell, K., and Weissmann, C. (1980) Nature 284, 316-320
33. Goeddel, D. V., Yelverton, E., Ullrich, A., Heyneker, H. L., Miozzari, G., Holmes, W., Seeburg, P. H., Dull, T., May, L., Stebbing, N., Crea, R., Maeda, S., McCandliss, R., Sloma, A., Tabor, J. M., Gross, M., Familletti, P. C., and Pestka, S. (1980) Nature 287, 411-416
34. Mantei, N., Schwarzstein, M., Streuli, M., Panen, S., Nagata, S., and Weissmann, C. (1980) Gene 10, 1-10
35. Streuli, M., Nagata, S., and Weissmann, C. (1980) Science 209, 1343-1347
36. Goeddel, D. V., Leung, D. W., Dull, T. J., Gross, M., Lawn, R. M., McCandliss, R., Seeburg, P. H., Ullrich, A., Yelverton, E., and Gray, P. W. (1981) Nature 290, 20-26
37. Lawn, R. M., Adelman, J., Dull, T. J., Gross, M., Goeddel, D. V., and Ullrich, A. (1981) Science 212, 1159-1162
38. Taniguchi, T., Sakai, M., Fujii-Kuriyama, Y., Muramatsu, M., Kobayashi, S., and Sudo, T. (1979) Proc. Jap. Acad. B55, 464-469
39. Taniguchi, T., Ohno, S., Fujii-Kuriyama, Y., and

- Muramatsu, M. (1980) *Gene* 10, 11-15
40. Houghton, M., Stewart, A. G., Doel, S. M., Emtage, J. S., Eaton, M. A. W., Smith, J. C., Patel, T. P., Lewis, H. M., Porter, A. G., Birch, J. R., Cartwright, T., and Carey, N. H. (1980) *Nucl. Acids Res.* 8, 1913-1931
 41. Derynck, R., Content, J., DeClercq, E., Volckaert, G., Tavernier, J., Devos, R., and Fiers, W. (1980) *Nature* 285, 542-549
 42. Lund, B., Edlund, T., Lindenmaier, W., Ny, T., Collins, J., Lundgren, E., and von Gabain, A. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81, 2435-2439
 43. Capon, D. J., Shepard, H. M., and Goeddel, D. V. (1985) *Mol. Cell. Biol.* 5, 768-779
 44. Weissmann, C., and Weber, H. (1986) *Progr. Nucl. Acid Res.* in press
 45. Nagata, S., Mantei, N., and Weissmann, C. (1980) *Nature* 287, 401-408
 46. Lawn, R. M., Gross, M., Houck, C. M., Franke, A. E., Gray, P. W., and Goeddel, D. V. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78, 5435-5439
 47. Ohno, S., and Taniguchi, T. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78, 5305-5309
 48. Degrave, W., Derynck, R., Tavernier, J., Haegeman, G., and Fiers, W. (1981) *Gene* 14, 137-143
 49. Nagata, S., Brack, C., Henko, K., Schamboack, A., and Weissmann, C. (1981) *J. Interferon Res.* 1, 333-336
 50. Brack, C., Nagata, S., Mantei, N., and Weissmann, C. (1981) *Gene* 15, 379-394
 51. Shaw, G., Boll, W., Taira, H., Mantei, N., Lengyel, P., and Weissmann, C. (1983) *Nucl. Acids Res.* 11, 555-573
 52. Higashi, Y., Sokawa, Y., Watanabe, Y., Kawade, Y., Ohno, S., Takaoka, C., and Taniguchi, T. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 9522-9529
 53. Weissenbach, J., Chernajovsky, Y., Zeevi, M., Shulman, L., Soreq, H., Nir, U., Wallach, D., Perricaudet, M., Tiollais, P., and Revel, M. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77, 7152-7156
 54. Zilberstein, A., Ruggieri, R., Korn, J. H., and Revel, M. (1986) *EMBO J.* 5, 2529-2537
 55. Content, J., De Wit, L., Pierard, D., Derynck, R., De Clercq, E., and Fiers, W. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79, 2768-2772
 56. Haegeman, G., Content, J., Volckaert, G., Derynck, R., Tavernier, J., and Fiers, W. (1986) *Eur. J. Biochem.* 159, 625-632
 57. Leung, D. W., Capon, D. J., Goeddel, D. V. (1984)

- Biotechnology 2, 458-464
58. Wilson, V., Jeffreys, A. J., Barrie, P. A., Boseley, P. G., Slocombe, P. M., Easton, A., and Burke, D. C. (1983) *J. Mol. Biol.* 166, 457-475
 59. Taniguchi, T., Mantei, N., Schwartzstein, M., Nagata, S., Muramatsu, M., and Weissmann, C. (1980) *Nature* 285, 547-549
 60. Owerbach, D., Rutter, W. J., Shows, T. B., Gray, P., Goeddel, D. V., and Lawn, R. M. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78, 3123-3127
 61. Trent, J. M., Olson, S., and Lawn, R. M. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79, 7809-7813
 62. 大野茂男 (1981) 蛋白質 核酸 酵素 別冊NO.25 (インターフェロン研究の進歩), 169-182
 63. Wheelock, E. F. (1965) *Science* 149, 310-311
 64. Langford, M. P., Stanton, G. J., and Johnson, H. M. (1978) *Infect. Immun.* 22, 62-68
 65. Nathan, I., Groopman, J. E., Quan, S. G., Bersch, N., and Golde, D. W. (1981) *Nature* 292, 842-844
 66. Sugamura, K., Matsuyama, M., Fujii, M., Kannagi, M., and Hinuma, Y. (1983) *J. Immunol.* 131, 1611-1612
 67. Matsuyama, M., Sugamura, K., and Hinuma, Y. (1984) *Microbiol. Immunol.* 28, 1333-1343
 68. Yip, Y. K., Barrowclough, B. S., Urban, C., and Vilček, J. (1982) *Science* 215, 411-413
 69. Yip, Y. K., Barrowclough, B. S., Urban, C., and Vilček, J. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79, 1820-1824
 70. Novick, D., Eshhar, Z., Fischer, D. G., Friedlander, J., and Rubinstein, M. (1983) *EMBO J.* 2, 1527-1530
 71. Kelker, H. C., Le, J., Rubin, B. Y., Yip, Y. K., Nagler, C., and Vilcek, J. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 4301-4304
 72. Rinderknecht, E., O'Connor, B. H., and Rodriguez, H. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 6790-6797
 73. Miyata, K., Yamamoto, Y., Ueda, M., Kawade, Y., Matsumoto, K., and Kubota, I. (1986) *J. Biochem.* 99, 1681-1688
 74. Gray, P. W., Leung, D. W., Pennica, D., Yelverton, E., Najarian, R., Simonsen, C. C., Derynck, R., Sherwood, P. J., Wallace, D. M., Berger, S. L., Levinson, A. D., and Goeddel, D. V. (1982) *Nature* 295, 503-508
 75. Derynck, R., Leung, D. W., Gray, P. W., and Goeddel, D. V. (1982) *Nucl. Acids Res.* 10, 3605-3615
 76. Devos, R., Cheroutre, H., Taya, Y., Degrave, W., Van Heuverswyn, H., and Fiers, W. (1982) *Nucl. Acids Res.* 10, 2487-2501
 77. Nishi, T., Fujita, T., Nishi-Takaoka, C., Saito, A.,

- Matsumoto, T., Sato, M., Oka, T., Itoh, S., Yip, Y. K., Vilček, J., and Taniguchi, T. (1985) *J. Biochem.* 97, 153-159
78. Gray, P. W., and Goeddel, D. V. (1982) *Nature* 298, 859-863
79. Taya, Y., Devos, R., Tavernier, J., Cheroutre, H., Engler, G., and Fiers, W. (1982) *EMBO J.* 1, 953-958
80. Orchansky, P., Novick, D., Fischer, D. G., and Rubinstein, M. (1984) *J. Interferon Res.* 4, 275-282
81. Sarkar, F. H., and Gupta, S. L. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81, 5160-5164
82. O'Rourke, E. C., Drummond, R. J., and Creasey, A. A. (1984) *Mol. Cell. Biol.* 4, 2745-2749
83. Rashidbaigi, A., Kung, H.-F., and Pestka, S. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 8514-8519
84. Taniguchi, T., Guarente, L., Roberts, T. M., Kimelman, D., Douhan III, J., and Ptashne, M. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77, 5230-5233
85. Jay, E., Rommens, J., Pomeroy-Cloney, L., MacKnight, D., Lutze-Wallace, C., Wishart, P., Harrison, D., Lui, W.-Y., Asundi, V., Dawood, M., and Jay, F. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81, 2290-2294
86. 谷口維紹 (1982) *生化学* 54, 363-377
87. 長田重一 (1982) *日本臨床* 40, 1766-1783
88. Palva, I., Lehtovaara, P., Kääriäinen, L., Sibakov, M., Cantell, K., Schein, C. H., Kashiwagi, K., and Weissmann, C. (1983) *Gene* 22, 229-235
89. Hitzeman, R. A., Leung, D. W., Perry, L. J., Kohr, W. J., Levine, H. L., and Goeddel, D. V. (1983) *Science* 219, 620-625
90. Rose, K., Simona, M. G., Offord, R. E., Prior, C. P., Otto, B., and Thatcher, D. R. (1983) *Biochem. J.* 215, 273-277
91. Le, J., Rubin, B. Y., Kelker, H. C., Feit, C., Nagler, C., and Vilček, J. (1984) *J. Immunol.* 132, 1300-1304
92. Colby, C. B., Inoue, M., Thompson, M., and Tan, Y. H. (1984) *J. Immunol.* 133, 3091-3095
93. Haynes, J., and Weissmann, C. (1983) *Nucl. Acids Res.* 11, 687-706
94. Scahill, S. J., Devos, R., Van der Heyden, J., and Fiers, W. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80, 4654-4658
95. Kaufman, R. J., and Sharp, P. A. (1982) *J. Mol. Biol.* 159, 601-621
96. Orth, G., Breitburd, F., Favre, M., and Croissant, O. (1977) *Origins of Human Cancer* (Hiatt, H. H., Watson, J. D., and Wisten, J. A.) pp1043-1068, Cold Spring Harbor Laboratory, New York

97. Chen, E. Y., Howley, P. M., Levinson, A. D., and Seeburg, P. H. (1982) *Nature* 299, 529-534
98. Sarver, N., Gruss, P., Law, M.-F., Khoury, G., and Howley, P. M. (1981) *Mol. Cell. Biol.* 1, 486-496
99. Law, M.-F., Lowy, D. R., Dvoretzky, I., and Howley, P. M. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78, 2727-2731
100. Binétruy, B., Meneguzzi, G., Breathnach, R., and Cuzin, F. (1982) *EMBO J.* 1, 621-628
101. Lowy, D. R., Dvoretzky, I., Shober, R., Law, M.-F., Engel, L., and Howley, P. M. (1980) *Nature* 287, 72-74
102. Turek, L. P., Byrne, J. C., Lowy, D. R., Dvoretzky, I., Friedman, R. M., and Howley, P. M. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79, 7914-7918
103. Lancaster, W. D. (1981) *Virology* 108, 251-255
104. Sarver, N., Byrne, J. C., and Howley, P. M. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79, 7147-7151
105. Fukunaga, R., Sokawa, Y., and Nagata, S. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81, 5086-5090
106. Razin, A. and Riggs, A. D. (1980) *Science* 210, 604-610
107. Ehrlich, M. and Wang, R. Y.-H. (1981) *Science* 212, 1350-1357
108. Felsenfeld, G. and McGhee, J. (1982) *Nature* 296, 602-603
109. Doerfler, W. (1983) *Ann. Rev. Biochem.* 52, 93-124
110. Bird, A. P. (1984) *Nature* 307, 503-504
111. Holliday, R. and Pugh, J. E. (1975) *Science* 187, 226-232
112. Wigler, M. H. (1981) *Cell* 24, 285-286
113. Stein, R., Gruenbaum, Y., Pollack, Y., Razin, A., and Cedar, H. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79, 61-65
114. Razin, A., Webb, C., Szyf, M., Yisraeli, J., Rosenthal, A., Naveh-Many, T., Sciaky-Gallili, N., and Cedar, H. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81, 2275-2279
115. Mavilio, F., Giampaolo, A., Carè, A., Migliaccio, G., Calandrini, M., Russo, G., Pagliardi, G. L., Mastroberardino, G., Marinucci, M., and Peschle, C. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80, 6907-6911
116. Compere, S.J. and Palmiter, R. D. (1981) *Cell* 25, 233-240
117. Wilks, A. F., Cozens, P. J., Mattaj, I. W., and Jost, J.-P. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79, 4252-4255
118. Wilks, A., Seldran, M., and Jost, J.-P. (1984) *Nucl. Acids Res.* 12, 1163-1177
119. Stewart, C. L., Stuhlmann, H., Jähner, D., and Jaenisch, R. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79, 4098-4102
120. Jähner, D., Stuhlmann, H., Stewart, C. L., Harbers, K., Lohler, J., Simon, I., and Jaenisch, R. (1982) *Nature* 298, 623-628

121. Ott, M.-O., Sperling, L., Cassio, D., Levilliers, J., Sala-Trepat, J., and Weiss, M. C. (1982) *Cell* 30, 825-833
122. Mohandas, T., Sparkes, R. S., and Shapiro, L. J. (1981) *Science* 211, 393-396
123. Groudine, M., Eisenman, R., and Weintraub, H. (1981) *Nature* 292, 311-317
124. Venolia, L., Gartler, S. M., Wassman, E. R., Yen, P., Mohandas, T., and Shapiro, L. J. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79, 2352-2354
125. Jaenisch, R., Schnieke, A., and Harbers, K. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 1451-1455
126. Stein, R., Razin, A., and Cedar, H. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79, 3418-3422
127. Busslinger, M., Hurst, J., and Flavell, R. A. (1983) *Cell* 34, 197-206
128. Keshet, I., Yisraeli, J., and Cedar, H. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 2560-2564
129. Rich, A., Nordheim, A., and Wang, A. H.-J. (1984) *Ann. Rev. Biochem.* 53, 791-846
130. Gerber-Huber, S., May, F. E. B., Westley, B. R., Felber, B. K., Hosbach, H. A., Andres, A.-C., and Ryffel, G. U. (1983) *Cell* 33, 43-51
131. Bower, D. J., Errington, L. H., Cooper, D. N., Morris, S., and Clayton, R.M. (1983) *Nucl. Acids Res.* 11, 2513-2527
132. Tanaka, K., Appella, E., and Jay, G. (1983) *Cell* 35, 457-465
133. Efrat, S., Pilo, S., and Kaempfer, R. (1982) *Nature*, 297, 236-239
134. Vaquero, C., Sanceau, J., Sondermeyer, P., and Falcoff, R. (1984) *Nucl. Acids Res.* 12, 2629-2640
135. Fukunaga, R., Matsuyama, M., Okamura, H., Nagata, K., Nagata, S., and Sokawa, Y. (1986) *Nucl. Acids Res.* 14, 4421-4436
136. Dulbecco, R., and Vogt, M. (1954) *J. Exp. Med.* 99, 167-182
137. Lawn, R. M., Fritsch, E. F., Parker, R. C., Blake, G., and Maniatis, T. (1978) *Cell* 15, 1157-1174
138. Yonehara, S. (1982) *Eur. J. Biochem.* 125, 529-533
139. Bolivar, F., Rodriguez, R., Greene, P. J., Betlach, M., Heyneker, H. L., Boyer, H. W., Crosa, J., and Falkow, S., II (1977) *Gene* 2, 95-113
140. Soberon, X., Covarrubias, L., and Bolivar, F. (1980) *Gene* 9, 287-305
141. Okayama, H. and Berg, P. (1982) *Mol. Cell. Biol.* 2,

- 161-170
142. O'Hare, K., Benoist, C., and Breathnach, R. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78, 1527-1531
 143. Wilson, J. T., Wilson, L. B., deRiel, J. K., Villa-Komaroff, L., Efstratiadis, A., Forget, B. G., and Weissman, S. M. (1978) Nucl. Acids Res. 5, 563-581
 144. Båyum, A. (1968) Scand. J. Clin. Lab. Invest. 21, (suppl 97) 77-89
 145. Nakane, A. and Minagawa, T. (1981) J. Immunol. 126, 2139-2142
 146. Moore, A. L. and Zusman, J. (1978) J. Immunol. Methods 23, 275-284
 147. Lowy, D. R., Rands, E., and Scolnick, E. M. (1978) J. Virol. 26, 291-298
 148. Gluzman, Y. (1981) Cell 23, 175-182
 149. Matsuyama, M., Sugamura, K., and Hinuma, Y. (1984) in "Abstracts; Sixth International Congress of Virology", pp.155, Sendai Japan
 150. Collins, S. J., Gallo, R. C., and Gallagher, R. E. (1977) Nature 270, 347-349
 151. Ho, M., Enders, J. F. (1959) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 45, 385-389
 152. Chirgwin, J. M., Przybyla, A. E., McDonald, R. J., and Rutter, W. J. (1979) Biochemistry 18, 5294-5299
 153. Aviv, H., and Leder, P. (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 69, 1408-1412
 154. Gurdon, J. B., Lingrel, J. B., and Marbaix, G. (1975) J. Mol. Biol. 80, 539-551
 155. Barth, L. G., and Barth, L. J. (1959) J. Embryol. Exp. Morph. 7, 210
 156. Efstratiadis, A., Kafatos, F. C., Maxam, A. M., and Maniatis, T. (1976) Cell 7, 279-288
 157. Hoeijmakers, J. H. J., Borst, P., Van den Berg, J., Weissmann, C., and Cross, G. A. M. (1980) Gene 8, 391-417
 158. Villa-Komaroff, L., Efstratiadis, A., Broome, S., Lomedico, P., Tizard, R., Naber, S. P., Chick, W. L., and Gilbert, W. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75, 3727-3731
 159. Van den Berg, J., Van Ooyen, A., Mantei, N., Schamböck, A., Grosveld, F., Flavell, R. A., and Weissmann, C. (1978) Nature 276, 37-44
 160. Curtiss, R. III et al (1977) Recombinant Molecules, Impact on Science and Society (eds. Beers, R. F. et al)pp. 45-56
 161. Nagata, S., Tsunetsugu-Yokota, Y., Naito, A., and Kaziro,

- Y. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80, 6192-6196
162. Kennedy, I. T. (personal communication)
 163. Hanahan, D., and Meselson, M. (1980) Gene 10, 63-67
 164. Wallace, R. B., Johnson, M. J., Hirose, T., Miyake, Y., Kawashima, E. H., and Itakura, K. (1981) Nucl. Acids Res. 9, 879-894
 165. Denhardt, D. T. (1966) Biochem. Biophys. Res. Commun. 23, 641-646
 166. Marmur, J. (1961) J. Mol. Biol. 3, 208
 167. Wilkie, N. M., Clements, J. B., Boll, W., Mantei, N., Lonsdale, D., and Weissmann, C. (1979) Nucl. Acids Res. 7, 859-877
 168. Gross-Bellard, M., Oudet, P., and Chambon, P. (1973) Eur. J. Biochem. 36, 32-38
 169. Maniatis, T., Fritsch, E. F., and Sambrook, J. (1982) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York)
 170. Weislander, L. (1979) Anal. Biochem. 98, 305
 171. Messing, J. (1983) Methods in Enzymology (Wu, R., Grossman, L., and Moldave, K., eds.) 101, pp.20-78, Academic Press, New York
 172. Holmes, D. S., and Quigley, M. (1981) Anal. Biochem. 114, 193
 173. Graham, F. L., and van der Eb, A. J. (1973) Virology 52, 456-467
 174. Wigler, M., Pellicer, A., Silverstein, S., and Axel, R. (1978) Cell 14, 725-731
 175. Edman, P., and Begg, G. (1967) Eur. J. Biochem. 1, 80-91
 176. Hunkapiller, M. W., and Hood, L. E. (1980) Science 207, 523-525
 177. Hunkapiller, M. W., and Hood, L. E. (1983) Science 219, 650-659
 178. Lehrach, H., Diamond, D., Wozney, J. M., and Boedtker, H. (1977) Biochemistry 16, 4743-4751
 179. Alwine, J. C., Kemp, D. J., and Stark, G. R. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74, 5350-5354
 180. Southern, E. M. (1975) J. Mol. Biol. 98, 503-517
 181. Wahl, G.M., Stern, M., and Stark, G.R. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 3683-3687
 182. Yip, Y. K., Pang, R. H. L., Oppenheim, J. D., Nachbar, M. S., Henriksen, D., Zerebeckyj-Eckhardt, I., and Vilček, J. (1981) Infect. Immun. 34, 131-139
 183. Yip, Y. K., Pang, R. H. L., Urban, C., and Vilček, J. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78, 1601-1605
 184. Devos, R., Cheroutre, H., Taya, Y., and Fiers, W. (1982) J. Interferon Res. 2, 409-420

185. Benton, W. D., and Davis, R. W. (1977) *Science* 196, 180-182
186. Nakabayashi, Y., Chattopadhyay, S. K., and Lowy, D. R. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80, 5832-5836
187. Masucci, M. G., Szigeti, R., Klein, E., Klein, G., Gruest, J., Montagnier, L., Taira, H., Hall, A., Nagata, S., and Weissmann, C. (1980) *Science* 209, 1431-1435
188. Tsukui, K., Fukunaga, R., Nagata, S., and Ito, K. (1986) *Microbiol. Immunol.* 30, in press
189. Laemmli, U. K. (1970) *Nature* 227, 680-685
190. Yamamoto, Y. (personal communication)
191. Mutsaers, J. H. G. M., Kamerling, J. P., Devos, R., Guisez, Y., Fiers, W., and Vliegenthart, J. F. G. (1986) *Eur. J. Biochem.* 156, 651-654
192. Endo, Y., Yamashita, K., Tachibana, Y., Tojo, S., and Kobata, A. (1979) *J. Biochem.* 85, 669-679
193. Baenziger, J. U. (1984) *The plasma proteins*, vol.IV (Putnam, F. W., ed.) pp. 271-315, Academic Press
194. Braude, I. A. (1984) *Biochemistry* 23, 5603-5609
195. Devos, R., Opsomer, C., Scahill, S. J., Van der Heyden, J., and Fiers, W. (1984) *J. Interferon Res.* 4, 461-468
196. Mory, Y., Ben-Barak, J., Segev, D., Cohen, B., Novick, D., Fischer, D. G., Rubinstein, M., and Revel, M. (1985) *Biology of the Interferon System 1984* (Kirchner, H., and Schellekens, H., eds.) pp. 33-41, Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam
197. Streuli, M., Hall, A., Boll, W., Stewart, W. E., II, Nagata, S., and Weissmann, C. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78, 2848-2852
198. Weck, P. K., Apperson, S., Stebbing, N., Gray, P. W., Leung, D., Shepard, H. M., and Goeddel, D. V. (1981) *Nucl. Acids Res.* 9, 6153-6166
199. Maeda, S., Kawai, T., Obinata, M., Fujiwara, H., Horiuchi, T., Saeki, Y., Sato, Y., Furusawa, M. (1985) *Nature*, 315, 592-594
200. Kuroda, K., Hauser, C., Rott, R., Klenk, H.-D., and Doerfler, W. (1986) *EMBO J.* 5, 1359-1365
201. Von Wussow, P., Platsoucas, C. D., Wiranowska-Stewart, M., and Stewart, W. E., II (1981) *J. Immunol.* 127, 1197-1200
202. Chang, T.-W., Testa, D., Kung, P. C., Perry, L., Dreskin, H. J., and Goldstein, G. (1982) *J. Immunol.* 128, 585-589
203. O'Malley, J. A., Nussbaum-Blumenson, A., Sheedy, D., Grossmayer, B. J., and Ozer, H. (1982) *J. Immunol.*

- 128, 2522-2526
204. Matsuyama, M., Sugamura, K., Kawade, Y., and Hinuma, Y.
(1982) J. Immunol. 129, 450-451
205. Munakata, T., Semba, U., Shibuya, Y., Kuwano, K., Akagi,
M., and Arai, S. (1985) J. Immunol. 134, 2449-2455
206. Klein, J. R., Pasternack, M. S., and Bevan, M. J. (1985)
J. Immunol. 134, 2456-2461
207. Gautsch, J. W. and Wilson, M. C. (1983) Nature 301, 32-37
208. Niwa, O., Yokota, Y., Ishida, H., and Sugahara, T. (1983)
Cell 32, 1105-1113
209. Goelz, S. E., Vogelstein, B., Hamilton, S. R., and
Feinberg, A. P. (1985) Science 228, 187-190
210. Wolf, S. F., and Migeon, B. R. (1982) Nature 295, 667-671
211. Shmookler Reis, R. J., and Goldstein, S. (1982) Proc.
Natl. Acad. Sci. U.S.A. 79, 3949-3953
212. Farrar, W.L., Ruscetti, F.W., and Young, H.A. (1985)
J. Immunol. 135, 1551-1554
213. Kawade, Y. (1980) J. Interferon Res. 1, 61-70
214. Miyata, T., Hayashida, H., Kikuno, R., Toh, H., and
Kawade, Y. (1985) Interferon 6, ed. Gresser, I.
(Academic Press), pp.1-30